

**Universidade Clássica de Lisboa**

**Faculdade de Ciências**

**Departamento de Biologia Animal**



**Caracterização das Populações Linfocitárias em Pacientes  
com Lúpus Eritematoso Sistémico, e sua relação com a  
actividade da doença**

**Maria Marta Gericota e Alvim Rodrigues**  
**Mestrado em Biologia Humana e do Ambiente**

**2007**

**Universidade Clássica de Lisboa**

**Faculdade de Ciências**

**Caracterização das Populações Linfocitárias em pacientes  
com Lúpus Eritematoso Sistémico, e sua relação com a  
actividade da doença**

Maria Marta Gericota e Alvim Rodrigues

Mestrado em Biologia Humana e do Ambiente

Dissertação orientada por:

Prof<sup>a</sup> Doutora Ana Maria Veigas Crespo, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

Dr. Luís Afonso Dutschmann, Hospital Fernando Fonseca em Lisboa

## **RESUMO**

O Lúpus Sistémico Eritematoso (LES) é uma doença autoimune, o que significa que resulta do ataque do sistema imunológico ao próprio organismo. Pouco se sabe acerca dos seus mecanismos patogénicos, contudo pode-se afirmar que para além da susceptibilidade genética, os factores hormonais, ambientais e imunológicos estão envolvidos na origem da doença. Após diagnóstico do LES, deve-se avaliar a actividade da doença para se estabelecer a terapia adequada.

Este trabalho pretende avaliar a actividade da doença e estabelecer uma relação com os valores das populações linfocitárias e de outros dados imunológicos, nomeadamente os factores C3 e C4 do complemento e a presença de autoanticorpos. Será feita a comparação em dois grupos, controlos e pacientes, com a finalidade de demonstrar a variação dos valores das populações linfocitárias e dos restantes parâmetros laboratoriais.

A actividade da doença foi avaliada segundo o índice SLEDAI, tendo sido considerados três níveis de actividade, alta, moderada e sem actividade, com base na determinação de parâmetros laboratoriais e na caracterização clínica, sendo a amostra constituída por 36 pacientes com LES e 31 controlos.

Foram classificados 9 pacientes com actividade considerada alta, 19 com moderada e 8 sem actividade da doença. Ao relacionar este índice com os valores das populações linfocitárias confirmou-se que quanto maior a actividade da doença menor o número absoluto das populações linfocitárias. Na avaliação dos dois grupos, obtiveram-se valores absolutos inferiores no grupo de pacientes em todas as subpopulações, embora na análise percentual se tenha obtido apenas nas populações CD4 e CD19 uma percentagem com diferença significativa, sendo menor o valor no grupo dos pacientes. Como os linfócitos CD4 direccionam a resposta imunitária, este facto pode explicar que os linfócitos B também se encontrem diminuídos. Os resultados obtidos poder-se-ão dever em parte à terapia administrada pelo que a avaliação destes valores com a evolução da doença serão de extrema utilidade. Os valores das fracções do complemento estão diminuídas em relação ao grupo controle e o anticorpo mais frequente no grupo dos pacientes foi o anti-dsDNA.

No âmbito desta linha de pesquisa sugere-se a utilização dos linfócitos T auxiliares como uma ferramenta útil na avaliação da actividade da doença bem como na resposta à terapêutica.

Palavras-chave: Doenças autoimunes, Lúpus Eritematoso Sistémico, Populações Linfocitárias e Actividade da Doença.

## **SUMMARY**

Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is an autoimmune disorder, meaning that it results from the attack of the immune system to the organism itself. Little is known about its pathogenic mechanisms. However, in addition to genetic susceptibility, other factors are involved in disease etiology such as hormonal, environmental and immunological issues. Upon establishing disease diagnosis, disease activity should be evaluated in order to apply adequate therapeutics.

The objective of this work was to find a correlation between disease activity and the different lymphocyte populations and other immunological parameters such as complement C3 and C4 molecules and the presence of autoantibodies. We have compared the levels of certain lymphocyte subpopulations between SLE patients and controls.

The disease activity has been evaluated according to the SLE disease activity index (SLEDAI), considering three disease activity levels (high, moderate and inactive), according to clinical and laboratorial parameters. The population sample consisted on 36 SLE patients and 31 controls.

Nine patients had high disease activity, while nineteen had moderate disease activity and eight had inactive disease. By correlating this index with the level of the lymphocyte populations, we have found that the higher the disease activity the lower the absolute number of all lymphocyte populations. However, only in the percentage CD4+ and CD19+ populations was found a significant decrease in the patient group. As the CD4+ lymphocytes shape the immune reaction, this fact can explain the reason why B lymphocytes are also decreased. Given that these results can partly be explained by the administered therapy, the evaluation of these parameters with disease evolution will be extremely helpful. The levels of the complement molecules are also diminished in relation to the control group, and the most common autoantibody present in patients is anti-dsADN.

In this context, we suggest the use of helper T lymphocytes as a valuable tool in monitoring disease activity as well as the response to therapeutics.

**Keywords:** disease autoimmune, systemic lupus erythematosus, lymphocyte populations, disease activity.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço em primeiro lugar ao Dr Luís Afonso Dutschmann pelo seu interesse e disponibilidade em participar neste trabalho. Percebi o quanto estava preocupado para que os pacientes participassem neste estudo e demonstrou sempre uma enorme boa vontade em discutir assuntos relacionados com este estudo. Mesmo ocupando tantas e importantes posições, disponibilizou, de forma exemplar, o seu tempo sempre que fui ao Hospital. Inicialmente fiquei impressionada com a enorme admiração que cada um dos seus pacientes tem por si, mais tarde percebi o porque e passei a ser mais uma das suas admiradoras não só profissionalmente, mas também pessoalmente nas suas relações humanas.

Foi essencial a sua colaboração na elaboração desta dissertação, não apenas sob o ponto visto clínico, mas no seu conjunto.

À Prof<sup>a</sup> Deodália Dias agradeço principalmente o facto de me ter indicado o Dr Luís Afonso Dutschmann e por toda a sua simpatia durante este período.

À Prof<sup>a</sup> Doutora Ana Maria Crespo que conheço desde a época da licenciatura e que nesta etapa tive o prazer de retomar o contacto, agradeço muito todas as suas sugestões e revisões. A sua experiência no mundo da investigação deu um enorme contributo neste estudo.

À Dra Ana Maria Mouzinho Moniz que desde o primeiro momento que falei do mestrado deu-me imenso apoio ao aparecerem as primeiras dificuldades. Foi a minha orientadora de estágio da carreira e continua a ser a minha “orientadora” em todos os sentidos, vejo-a como exemplo a seguir.

Foi graças à sua boa vontade que este trabalho teve “pernas para andar”, pois disponibilizou não só os seus conhecimentos, como vários recursos laboratoriais essenciais para a realização deste estudo. Tenho a certeza que qualquer palavra que utilize para esprestar tudo o que fez e que tem feito por mim é pouco...

À Dra. Adoracion Gorjon agradeço a sua participação, tal como da sua equipe ao colaborar na determinação de alguns dos parâmetros laboratoriais. Ouvi vários elogios

sobre si e sobre o seu profissionalismo, só posso confirmar todas essas características extremamente louváveis.

À Enfermeira Tina Thorsoe agradeço a amabilidade que teve em fazer as colheitas dos pacientes no hospital sempre com simpatia e eficiência.

A todos os doentes da Associação dos Doentes com Lúpus e da consulta do Dr Luís Afonso Dutschmann um especial OBRIGADO, pois sem eles este trabalho não teria qualquer fundamento. Estas pessoas que conheci pouco, mas que mostraram ser grandes, desejo que tenham o maior sucesso nas suas vidas.

Em especial agradeço à Isabel Reis que sendo a responsável da Associação organizou de forma rápida e eficaz as colheitas e disponibilizou toda a informação sempre que a solicitei. Por todo o trabalho que teve e pela sua enorme competência e simpatia um enorme obrigado.

Às colegas do instituto agradeço o incentivo e a paciência que tiveram durante este período, especialmente à Paula pelo trabalho que teve que assegurar na etapa final deste trabalho. À Dra Teresa Paixão, Dra Luisa Rodrigues, Dra Adelina Gomes e Dra Helena Martins agradeço a preocupação e interesse em ajudar-me logo no início deste percurso.

À Doutora Marta Barreto que conheci devido ao tema que escolhi para esta tese, agradeço desde início a sua simpatia. Procurei-a na expectativa de obter alguma da sua bibliografia e proporcionei-me bastante mais... Para além da sua tese, que disponibilizou de imediato, agradeço toda a sua colaboração.

À Patrícia, Rita, Paulo e Ilídia agradeço tudo o que fizeram e especialmente a vontade que tiveram em ajudar-me que foi muito importante para a elaboração deste trabalho.

Ao Dr. Baltazar Nunes agradeço pela enorme ajuda no tratamento estatístico dos dados desta dissertação.

À Cristina Verissimo agradeço o empurrão que deu para eu iniciar este mestrado... Como grande amiga que é teve que aguentar alguns desabafos ao longo deste período,

mas acabando esta etapa outras virão e espero continuar a ter ao meu lado esta grande amiga.

Aos meus pais por todo o trabalho que tiveram ao investirem na minha formação profissional e pessoal um especial obrigado.

Aos meus irmãos, cunhados e sogros agradeço as palavras amigas e de incentivo e em especial a minha gémea Inês um grande obrigado por mais uma fase de “estudo” que teve que aguentar da sua mana.

Aos meus filhos, Catarina, Tomé e Simão peço desculpa pelo tempo que retirei para este estudo ao invês de “estar” mais com eles... Ao meu marido Pedro agradeço não só o facto de ter-me entusiasmado desde o início mas também por me ter ajudado em casa e ainda na elaboração deste trabalho. Com o se apoio em todos (foram muitos) os aspectos foi possível elaborar esta dissertação e por isso vai um GIGANTE OBRIGADO.



## ÍNDICE

Resumo .....	iii
Summary .....	iv
Agradecimentos.....	v
Índice .....	ix
Índice de Anexos.....	x
Índice de Figuras .....	xi
Índice de Quadros.....	xii
Abreviaturas .....	xiii
1 INTRODUÇÃO .....	1
1.1 Sistema Imunitário.....	1
1.1.1 Composição do sistema imunitário .....	1
1.1.2 Mecanismos de defesa.....	2
1.2 Doenças autoimunes .....	10
1.3 Lupus eritematoso sistémico .....	15
1.3.1 Perspectiva Histórica.....	15
1.3.2 Manifestações clínicas e diagnóstico .....	17
1.3.3 Epidemiologia e origem .....	18
1.3.4 Actividade da doença .....	23
2 OBJECTIVOS.....	27
3 AMOSTRAS E MÉTODOS .....	28
3.1 Grupos de estudo .....	28
3.2 Metodologias utilizadas .....	28
3.2.1 Obtenção e Preparação das Amostras .....	28
3.2.2 Citometria de Fluxo .....	29
3.2.3 Imunofluorescência Indirecta .....	32
3.2.4 ELISA ( <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> ).....	37
3.2.5 Immunoblotting .....	37
3.2.6 Nefelometria .....	40
3.2.7 Avaliação da actividade da doença .....	41
3.2.8 Estatística.....	41

4	RESULTADOS.....	43
4.1	Frequência dos sintomas nos pacientes com LES .....	43
4.2	Avaliação da actividade da doença e sua relação com os principais sintomas clínicos.....	44
4.3	Frequência dos autoanticorpos no grupo de pacientes com LES .....	47
4.4	Determinação dos factores C3 e C4 do complemento nos dois grupos e sua relação com a presença do anticorpo anti-dsDNA no grupo de pacientes com LES..	48
4.5	Relação dos valores absolutos e percentuais das populações linfocitárias no grupo de pacientes com LES com o grupo controlo. ....	51
4.6	Relação dos valores absolutos e percentuais das populações linfocitárias segundo a actividade da doença, no grupo de pacientes com LES .....	58
4.7	Relação dos factores C3 e C4 do complemento com a actividade da doença.	62
4.8	Relação da classe terapêutica com a actividade da doença.....	63
5	DISCUSSÃO E CONCLUSÃO .....	65
6	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	71
7	BIBLIOGRAFIA.....	72

## **ÍNDICE DE ANEXOS**

ANEXO 1 – Critérios de classificação criados pelo American College Rheumatology para definir um indivíduo com LES.
ANEXO 2 - Índice de SLEDAI (Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index)
ANEXO 3 – Sintomatologia dos pacientes com LES
ANEXO 4 - Parâmetros laboratoriais determinados nos pacientes com LES
ANEXO 5 - Parâmetros laboratoriais determinados no grupo dos controlos
ANEXO 6 - Valores das populações linfocitárias nos pacientes com LES
ANEXO 7 - Valores das populações linfocitárias no grupo dos controlos
ANEXO 8 – Relação da actividade da doença com a classe terapêutica

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática dos órgãos que constituem o sistema imunitário	2
Figura 2 - Tipos de resposta dos linfócitos T CD4+(Modificado de Corell, 2006)	8
Figura 3 - Distribuição das subpopulações linfocitárias com os respectivos marcadores celulares	32
Figura 4 - Método de Imunofluorescência Indirecta –IFI (Técnicas Imunológicas)	33
Figura 5 - Relação dos anticorpos anti-nucleares (ANA) e determinadas patologias autoimunes (Adaptado de Humbell, 1994)	34
Figura 6 – Aspecto Homogéneo das células Hep-2 (www.labodia.com/en7ana/Atlas/anaatlasnuclear.htm)	35
Figura 7 – Aspecto Mosqueado das células Hep-2 (www.labodia.com/en7ana/Atlas/anaatlasnuclear.htm)	36
Figura 8 – Aspecto Periférico das células Hep-2 (www.labodia.com/en7ana/Atlas/anaatlasnuclear.htm)	36
Figura 9 - Método de ELISA - <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (Técnicas Imunológicas)	37
Figura 10 - Frequências dos sintomas no grupo de pacientes com LES	43
Figura 11 - Frequências das ENAs nos pacientes com títulos positivos de anticorpos anti-nucleares	47
Figura 12 - Concentração do factor C3 do complemento nos dois grupos	48
Figura 13 - Concentração do factor C4 do complemento nos dois grupos	49
Figura 14 - Relação entre os factores C3 e C4 do complemento nos dois grupos	50
Figura 15 - Relação do factor C4 do complemento com o dsDNA	51
Figura 16 - Valores de Linfócitos totais nos dois grupos	52
Figura 17 - Análise dos valores absolutos dos CD4 nos dois grupos	53
Figura 18 - Análise dos valores absolutos dos CD8 nos dois grupos	53
Figura 19 - Análise dos valores absolutos dos CD3 nos dois grupos	54
Figura 20 - Análise dos valores absolutos dos CD19 nos dois grupos	54
Figura 21 - Análise dos valores absolutos dos CD16 nos dois grupos	55
Figura 22 - Percentagem dos CD4 nos dois grupos	56
Figura 23 - Percentagem dos CD19 nos dois grupos	56
Figura 24 - Comparação da razão CD4/CD8 nos dois grupos	57
Figura 25 - Análise dos valores absolutos dos Linfócitos totais em função da actividade da doença	58
Figura 26 - Análise dos valores absolutos dos CD4 em função da actividade da doença	59
Figura 27 - Análise dos valores absolutos dos CD8 em função da actividade da doença	59
Figura 28 - Análise dos valores absolutos dos CD3 em função da actividade da doença	60
Figura 29 - Análise dos valores absolutos dos CD19 em função da actividade da doença	60
Figura 30 - Análise dos valores absolutos dos CD16 em função da actividade da doença	61
Figura 31 - Concentração do factor C3 em função da actividade da doença	62
Figura 32 - Concentração do factor C4 em função da actividade da doença	62
Figura 33 - Relação da classe terapêutica com a actividade da doença	63

## ÍNDICES DE QUADROS

Quadro 1 - Características dos grupos de diferenciação (CD = <i>cluster of differentiation</i> ) .....	31
Quadro 2 - Atribuição da Actividade da Doença adaptando o índice SLEDAI .....	45
Quadro 3 - Relação dos sintomas mais frequentes com a actividade da doença .....	46
Quadro 4 - Relação dos sintomas menos frequentes com a actividade da doença .....	46
Quadro 5 - Relação das alterações cutâneas e artrite com a actividade da doença.....	46

## ABREVIATURAS

ACR – Colégio Americano de Reumatologistas  
AMA- M2 – Anticorpos anti-mitocondriais do tipo 2  
ANA – Anticorpos anti-nucleares  
APC - Alofococianina  
BCR – Receptor de superfície das células B  
BILAG - *British Isles Lupus Assessment Group*  
C1...C9 – Factores do sistema do complemento  
CD – Grupo de diferenciação (*cluster of differentiation*)  
CD4 – Receptores de superfície para os linfócitos T auxiliares  
CD8 – Receptores de superfície para os linfócitos T citotóxicos e supressores  
CD3 – Receptores de superfície para os linfócitos T  
CENP B – Anticorpos anti-centrómero  
CTLA 4 – Antígeno 4 do linfócito T citotóxico  
CH50 – Complemento total  
DNA – Ácido desoxiribonucleico  
dsDNA – Anticorpos anti-DNA de cadeia dupla  
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético  
EIA – Ensaio imunoenzimático  
ELISA – *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*  
ENA – Antígenos extraíveis do núcleo (*Extractable Nuclear Antigens*)  
FITC – Isotiocianato de fluoresceína  
FSC – *Foward Scatter*  
HLA – Antígenos leucocitários humano (*Human Leukocyte Antigen*)  
IFI – Imunofluorescência indirecta  
Ig – Imunoglobulinas  
IL – Interleucinas  
JO-1 – Anticorpos anti - citoplasmáticos  
LAI – *Lupus Activity Index*  
LES – Lúpus eritematoso sistémico  
MBL - Lectina ligada de manose (*Mannose Binding Lectin*)  
MHC – Complexo maior de histocompatibilidade (*Major Histocompatibility Complex*)  
NK- Células *Natural Killer*  
PBS – Tampão fosfato salino  
PCR - Proteína C Reactiva  
PCNA – *Proliferating Cell Nuclear Antigen*  
PE – Ficoeritrina  
PerCP – Peridina clorofila  
RNA – Ácido ribonucleico  
RNP – Ribonucleoproteína  
Sm – abreviatura de Smith para designar uma ribonucleoproteína  
SLAM – *Systemic Lupus Activity Measures*  
SLEDAI - *Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index*  
SLICC/ACR - *Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatologists*  
SSC - *Side Scatter*  
SSA/Ro, SSB/La – Ribonucleoproteínas  
TCR – Receptor de superfície das células T  
Th1, Th2 – Tipos de resposta desencadeadas pelos linfócitos T auxiliares ou helpers

VAS – Escala analógica visual

## **1 INTRODUÇÃO**

### **1.1 Sistema Imunitário**

#### **1.1.1 Composição do sistema imunitário**

O sistema imunitário humano é composto por órgãos linfóides, células e moléculas que estabelecem entre si uma complexa rede de comunicações com a finalidade de defesa contra infecções provocadas por agentes patogénicos (Roitt et al., 2001; Goldsby et al., 2003).

Os tecidos linfóides distribuem-se por diversos locais do organismo. O tecido linfóide pode estar acumulado formando os nódulos linfáticos, que se interpõem entre os vasos linfáticos do organismo, ou fazer parte do parênquima de determinados órgãos. Esses tecidos são classificados em primários e secundários. Os primários representam o local onde ocorre a formação e a maturação dos linfócitos. O timo e a medula óssea são tecidos primários, pois é o local onde amadurecem os linfócitos T e B (hematopoiese), respectivamente. Os tecidos primários não formam células activas na resposta imunitária, mas sim, apenas células até ao estadio de pró-linfócito. Os tecidos linfóides secundários são os que, efectivamente, participam na resposta imunitária, quer humoral (mediada por células B), quer celular (mediada por células T). As células presentes nesses tecidos secundários tiveram origem nos tecidos primários, e migram pela circulação até atingirem os diferentes tecidos do organismo. Neles estão presentes os nódulos linfáticos difusos, ou encapsulados como os nódulos linfáticos, as placas de Peyer, o baço e a medula óssea (Figura 1). Por conseguinte, salienta-se a medula óssea que, funciona simultaneamente como órgão primário e secundário (Goldsby et al., 2003).

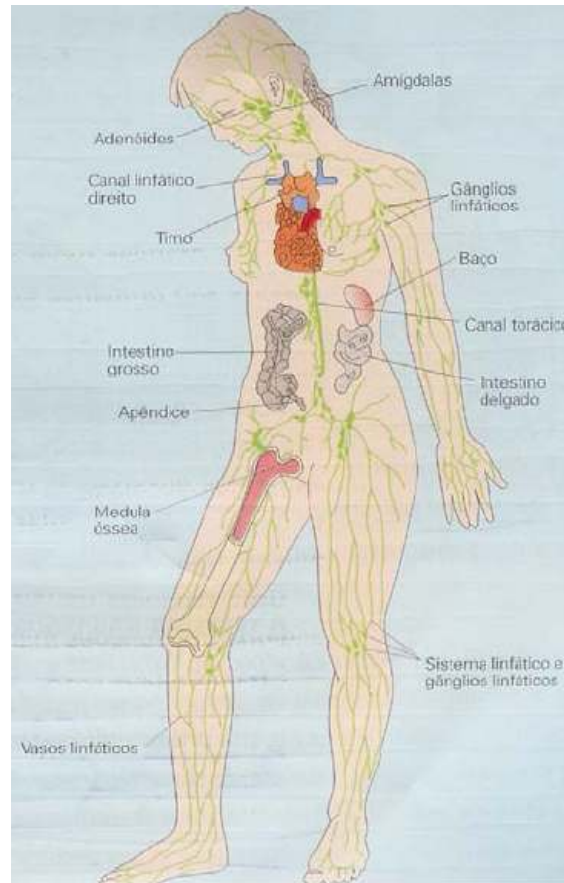


Figura 1 - Representação esquemática dos órgãos que constituem o sistema imunitário  
(Roitt et al., 2001)

O sistema linfático é constituído por capilares linfáticos, vasos linfáticos, folículos linfóides e nódulos linfáticos, denominando-se o líquido que circula através dele por linfa, que se encontra espalhado por todo o corpo. Este sistema desempenha um importante papel na defesa imunitária, pois serve de meio de transporte para antígenos e linfócitos. Os antígenos estranhos que estão nos tecidos, ao serem captados pelos capilares linfáticos, são levados para tecidos linfóides organizados: os folículos linfóides ou os nódulos linfáticos (Roitt et al., 2001).

#### 1.1.2 Mecanismos de defesa

O nosso organismo possui mecanismos de defesa que podem ser diferenciados quanto à sua especificidade, ou seja, existem os específicos contra o antígeno e os não-específicos que protegem o organismo de qualquer material ou microorganismo estranho, sem que este seja específico.



a) As respostas imunitárias não-específicas

São aquelas em que não há uma reacção contra um epítopo, mas sim contra um antigénio que se encontra no local, não sendo ele específico, mas qualquer substância estranha ao organismo (Roitt et al., 2001).

- O organismo possui barreiras naturais que não são específicas, como a pele (queratina, lípidos e ácidos gordos), a saliva e o muco presente nas mucosas e no tracto respiratório. Os mecanismos de defesa não específica que actuam sobre os agentes patogénicos que conseguiram transpor as barreiras externas são a reacção inflamatória, a fagocitose, o interferão e o sistema complemento. Neste tipo de resposta estão presentes certos tipos de células como, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e as células Natural Killer (Goldsby et al., 2003).

- A reacção inflamatória é fundamentalmente uma reacção não-específica, apesar de ser na prática controlada por mecanismos específicos. Caracteriza-se por cinco sintomas, definidos desde a antiguidade greco-romana: calor, rubor, tumor (tumefacção), dor e perda de função. A inflamação é desencadeada por factores libertados pelas células danificadas, mesmo se por danos mecânicos. Esses mediadores (como a histamina) sensibilizam os receptores da dor, e produzem vasodilatação local (rubor e tumor), mas também atraem os fagócitos, principalmente neutrófilos desencadeando-se a resposta inflamatória.

- Os fagócitos são as células, como neutrófilos e macrófagos, que têm a capacidade de estender porções celulares (os pseudópodes) de forma direccionada, englobando uma partícula ou microorganismo estranho. Os fagócitos reagem a citocinas produzidas pelos linfócitos, mas também fagocitam, ainda que menos eficazmente, de forma autónoma sem qualquer estimulação. Naturalmente esta forma de defesa é importante contra infecções bacterianas, já que os vírus são demasiado pequenos e a maioria dos parasitas grandes para serem fagocitados.

A fagocitose também é importante na “limpeza” dos detritos celulares após infecção ou outro processo que leve à morte celular nos tecidos. No entanto, os fagócitos morrem após algumas fagocitoses, e se o número de invasores e de detritos for grande, poderão ambos, fagócitos e bactérias, ficar presos num líquido pastoso e rico em proteínas, que se denomina pus [[http://wikipedia.org/wiki/Immune\\_system](http://wikipedia.org/wiki/Immune_system)].

- Os interferões são proteínas produzidas por certas células quando atacadas por vírus ou por parasitas intracelulares. Estas proteínas não apresentam especificidade pois

podem inibir a replicação de diversos vírus. Os interferões difundem-se, entram na circulação e ligam-se à membrana citoplasmática de outras células, induzindo-as a produzir proteínas antivirais que inibem a replicação desses vírus. O interferão não é uma proteína antivírica mas induz a célula a produzir moléculas proteicas antivirais [[http://pwp.netcabo.pt/sistema.imune/sistema\\_imunitario.htm](http://pwp.netcabo.pt/sistema.imune/sistema_imunitario.htm)].

- O sistema de complemento é um grupo de proteínas produzidas pelo fígado, presentes na circulação normalmente na forma inactiva. As várias proteínas são designadas pela ordem da sua descoberta (C1, C2...até C9) e os produtos de clivagem (fragmentos) das moléculas do complemento contêm uma letra minúscula. Essas proteínas actuam em cadeia, e podem actuar por três vias: a clássica, alternativa e lectina. As imunoglobulinas IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> e IgM na forma de agregados ou de complexos antígeno-anticorpo activam o complemento pela via clássica. A via alternativa é activada por certos produtos microbianos ou antígenos, a sua activação envolve o factor C<sub>3</sub> sem envolver os anteriores C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> e C<sub>4</sub>. A via da lectina, embora seja pouco conhecida, sabe-se que é activada por uma proteína similar a C<sub>1</sub>Q, chamada lectina ligada à manose (MBL – *mannose binding lectin*) (Abbas & Lichtman, 2003; Roitt et al., 2001).

O sistema do complemento é um elo fundamental entre as respostas inflamatória e imunitária. Em relação ao complemento é fácil evidenciar a forma como ele liga a inflamação à imunidade adquirida: os principais activadores do complemento por via clássica são os anticorpos da classe IgG e IgM (Resposta Imunitária) e a Proteína-C-Reactiva (Resposta Inflamatória). Por outro lado, a activação por via alternativa é característica dos fenómenos dependentes de respostas biológicas como a inflamação, ou mesmo da acção directa de microorganismos e substâncias químicas.

Este tipo de respostas denominada imunidade inata ou natural desempenham uma acção geral contra corpos estranhos, independentemente da sua natureza, e exprimem-se sempre da mesma forma (Roitt et al., 2001, Goldsby et al., 2003).

#### b) As respostas imunitárias específicas

São aquelas que envolvem a acção de epítomos específicos, formando populações monoclonais específicas para atacar o antígeno em questão, (Goldsby et al., 2003) e podem ser subdivididas em três funções: o reconhecimento do agente invasor como corpo estranho, a reacção do sistema imunitário que prepara agentes específicos que

intervêm no processo e a acção desses agentes que neutralizam e destroem os corpos estranhos.

Em contraste com a imunidade inata, estes mecanismos de defesa aumentam a capacidade defensiva a cada exposição sucessiva a um microorganismo. Como esta forma de imunidade se desenvolve em resposta à infecção e se adapta a esta, é designada por imunidade adquirida. Esta tem grande especificidade para as distintas macromoléculas e capacidade de memória para responder mais rapidamente às repetidas exposições ao mesmo microorganismo. Neste tipo de respostas estão envolvidos os linfócitos B e/ou T que, para além de elevada eficiência no combate aos microorganismos invasores são, também, os responsáveis pela “limpeza” do organismo, ou seja, a retirada de células mortas, a renovação de determinadas estruturas, a rejeição de enxertos e a memória imunológica (Abbas & Lichtman, 2003; Roitt et al., 2001).

Existem dois tipos de respostas imunes adquiridas, designadas imunidade humoral (mediada por anticorpos) e imunidade celular (mediada por células).

- Na imunidade humoral, quando um antígeno entra no organismo e chega a um órgão linfóide, vai estimular os linfócitos B que possuem na membrana receptores específicos para esse antígeno, os BCR (*B Cell Receptors*). Como resposta, os linfócitos B dividem-se e formam células que sofrem diferenciação, originando plasmócitos e células memória.

As células memória ficam inactivas, mas prontas a responder rapidamente, caso venha a acontecer um posterior contacto com o antígeno (Abbas & Lichtman, 2003).

Os plasmócitos têm um retículo endoplasmático desenvolvido e produzem anticorpos específicos para cada antígeno. Os anticorpos são posteriormente lançados no sangue ou na linfa e vão circular até ao local de infecção.

Os anticorpos podem actuar de formas distintas. Podem actuar através da sua ligação a toxinas bacterianas levando à sua neutralização, ou neutralizam completamente partículas virais e células bacterianas através da sua ligação às mesmas e neste caso o complexo anticorpo-antígeno é ingerido e degradado por macrófagos, e ainda podem levar à activação do sistema complemento que no âmbito da defesa específica, é feita através do revestimento de uma célula bacteriana por anticorpos. Os anticorpos fixos formam receptores para a primeira proteína do sistema complemento o que leva ao desenvolvimento de uma sequência de reacções que conduz a formação de poros e à destruição da célula. O revestimento de antígenos por anticorpos é reconhecido como

elemento estranho pelos fagócitos (macrófagos e leucócitos polimorfonucleares) que os ingerem e destroem. Este processo designa-se por opsonização (Roitt et al., 2001, Goldsby et al., 2003).

Há vários tipos de anticorpos, as IgM perfazem 10% do conjunto de imunoglobulinas, sua estrutura é pentamérica, as IgM são encontradas principalmente no espaço intravascular, sendo uma classe de anticorpos “precoces” (são produzidas nas fases agudas das doenças que desencadeiam resposta humoral), sendo encontradas na superfície dos linfócitos B na forma monomérica, realizando a função de receptor de antígenos; as IgG são imunoglobulinas monoméricas simples que perfazem 80% das imunoglobulinas do organismo. São os anticorpos principais nas respostas imunes secundárias, podem activar o complemento e auxiliam a fagocitose por se ligar a macrófagos; as IgA representam 15-20% das imunoglobulinas do soro humano, no homem mais de 80% da IgA ocorre sob a forma monomérica e está presente no sangue. As IgA são as imunoglobulinas predominantes em secreções: saliva, lágrimas, leite e mucosas. O seu principal papel é o de proteger o organismo de invasão viral ou bacteriana através das mucosas; as IgE estão presentes no soro em baixas concentrações, são encontradas na membrana de superfície de basófilos e mastócitos. Têm um papel importante na imunidade activa contra parasitas atraindo os eosinófilos. Os doentes alérgicos normalmente têm altos níveis de IgE. As IgE ligadas aos mastócitos ao reagirem com o antígeno levam à libertação de histamina, citocinas e de outros factores que servem de mediadores da vasodilatação, contracção de músculo liso, aumento da permeabilidade vascular e quimioatração de outras células inflamatórias. Por fim as IgD que estão presentes em concentrações muito baixas, encontram-se na superfície dos linfócitos, porém as suas funções ainda são desconhecidas (Bernard et al, 1976, Goldsby et al., 2003)

- A imunidade celular é mediada por linfócitos T. Os microorganismos intracelulares, tais como vírus e algumas bactérias, sobrevivem e proliferam dentro dos fagócitos e de outras células do hospedeiro, onde ficam inacessíveis aos anticorpos em circulação. A defesa contra essas infecções é uma das funções deste tipo de imunidade, que promove a destruição dos microorganismos que residem nos fagócitos ou a lise das células infectadas. As células mais desenvolvidas e especializadas sob o ponto de vista imunológico são os linfócitos T e B (Abbas & Lichtman, 2003).

O nome linfócito T deriva das células serem dependentes do “timo” para o seu desenvolvimento, sendo então o “T” de “Timo-dependentes”. Os linfócitos T expressam à sua superfície o receptor TCR (*T-cell receptor*) específico para as células T (que funcionalmente serve para reconhecer o antígeno que lhe é apresentado e activar os linfócitos) e o CD3 (indicando o CD “grupo de diferenciação” e referindo-se a uma molécula reconhecida por um grupo de anticorpos monoclonais usados para identificar uma linhagem ou estágio de diferenciação do linfócito) (Abbas & Lichtman, 2003). Funcionalmente estes linfócitos são separados em linfócitos T auxiliares ou helper (LTh), linfócitos T citotóxicos (LTc) e os linfócitos T supressores (LTs).

Os linfócitos T auxiliares, possuem o receptor CD4 na sua superfície, são os controladores de toda a resposta imunitária. São eles que “decidem” que reacções desenvolver a uma invasão, activando ou inibindo todas as outras células imunitárias através de citocinas (mediadores moleculares). Daí que na doença que ataca os próprios linfócitos CD4, tal como a síndrome da imunodeficiência adquirida - SIDA, todo o sistema imunitário colapse.

Os linfócitos CD4 conseguem “decidir” se há invasão ou não porque cada um deles contém um receptor gerado aleatoriamente numa fase de recombinação genética do seu desenvolvimento, denominado TCR (semelhante aos anticorpos das células B). Todos os fagócitos e ainda algumas outras células como as células dendríticas ou de Langerhans, depois de digerir as proteínas do invasor, apresentam péptidos delas numa proteína membranar, o MHC (*major histocompatibility complex*) da classe II. Os TCR dos CD4 ligam-se a essas MHC com péptido e se a ligação for eficaz, libertam citocinas. Nenhum linfócito CD4 tem receptores para proteínas do próprio corpo porque esses linfócitos foram destruídos na sua fase de desenvolvimento no Timo. Se os níveis das citocinas forem suficientemente altos, e se outros factores menos conhecidos existirem no sangue, o CD4 “decide” que há uma invasão e de que tipo é, dando origem a uma resposta imunitária específica. Ele então produz outras citocinas estimulando todas as outras células para o tipo de resposta apropriado. Tal como todos os outros linfócitos, os CD4 estimulados multiplicam-se e alguns servem de células-memória para mais rápida resposta ao invasor no futuro (Nikolich-Zugich et al, 2004, Roitt et al., 2001).

Há basicamente dois tipos de células CD4 auxiliares, correspondendo a dois tipos de resposta (Figura 2). Não se sabe exactamente o que desencadeia um tipo ou o outro. A

resposta Th1 caracteriza-se por produção de citocinas como interleucina-2 (estimula a multiplicação dos linfócitos T e B), interferão-gama (activa os macrófagos, tornando-os mais eficientes e agressivos, promove a inflamação, e estimula a resposta Th1, inibindo a Th2) e o factor de necrose tumoral-beta (activa os fagócitos, estimula a resposta citotóxica Th1). Há activação dos macrófagos e da fagocitose, e dos mecanismos citotóxicos (linfócitos T), levando a extensa destruição das zonas infectadas. É eficaz na eliminação dos patogénicos intracelulares (vírus e bactérias). Na resposta Th2 há secreção de interleucina-4 (estimula multiplicação dos linfócitos B, produção de anticorpos, resposta do tipo Th2) e interleucina-5 (estimula a multiplicação e diferenciação de linfócitos B e a produção de IgA e IgE). Caracteriza-se pelo estímulo da produção de anticorpos pelos linfócitos B. É eficaz contra os organismos que circulem no sangue, como bactérias extracelulares e parasitas (Abbas & Lichtman, 2003; Roitt et al., 2001).

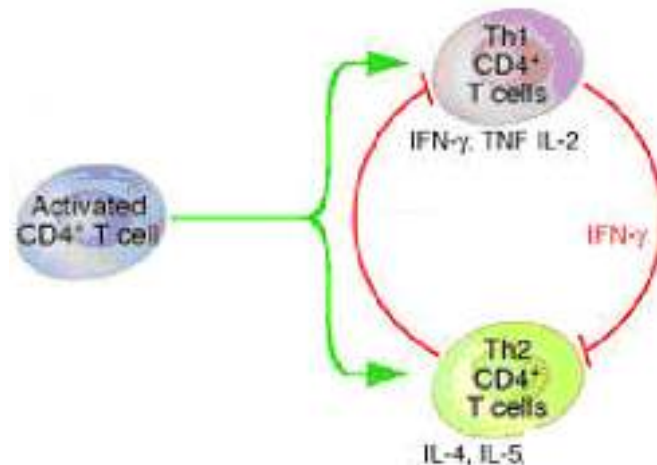


Figura 2 - Tipos de resposta dos linfócitos T CD4+(Modificado de Corell, 2006)

Os linfócitos T citotóxicos (CD8), têm cada um, um tipo de receptor específico nas suas membranas, o TCR (*T-cell receptor*). Esses receptores ligam-se a moléculas que todas as células humanas possuem (da classe I do complexo MHC), e que apresentam péptidos (fragmentos de proteínas) que estejam a produzir à superfície da célula. No caso dos complexos MHC I – péptido serem reconhecidos por uma célula CD8, esta última desencadeará a morte da célula que apresenta o péptido (Nikolich-Zugich et al, 2004; Roitt et al., 2001).

Todos os linfócitos CD8 que têm receptores que reagem a substâncias do próprio organismo morrem durante o seu “estágio” no timo. Quando o linfócito CD8 reconhece um antígeno “não – próprio” com o seu receptor numa molécula MHC classe I de uma célula do organismo, ele liberta substâncias (perforina) que criam um poro na membrana, lisando (rebetando osmoticamente) a célula, ou então libertam mediadores que induzem as células a iniciar a apoptose (morte celular programada). Normalmente o linfócito CD8 naíve só mata as células se for estimulado por citocinas dos linfócitos CD4. Se um linfócito CD8 com determinado receptor for estimulado dessa forma, ele divide-se em mais células citotóxicas e num pequeno grupo de células quiescentes e de longa esperança de vida, as células de memória, que se manterão em circulação. Estas células de memória poderão ser activadas mais tarde de uma forma mais eficiente, mais rápida e independentemente da presença de citocinas produzidas pelos linfócitos CD4, elas reconhecem e destroem células infectadas ou células cancerosas. Quando estão activas, migram para o local de infecção ou para o timo e segregam substâncias tóxicas que matam as células anormais [[http://wikipedia.org/wiki/Immune\\_system](http://wikipedia.org/wiki/Immune_system)]. As moléculas da classe II do MHC produzidas por macrófagos e linfócitos B, têm a função de liga-los aos linfócitos T auxiliares para lhes apresentar o antígeno, através da interacção CD4-MHC – II e TCR – epítipo. O seu papel estimulador é devido a interleucina-2 (IL-2), produzida pelos linfócitos auxiliares, que causa a expansão clonal de linfócitos citotóxicos monoclonais na resposta imunitária celular (Nikoloch-Zugich et al., 2004).

Os linfócitos T supressores têm a função de modular a resposta imune através da inibição da mesma, eles inactivam os linfócitos T citotóxicos e auxiliares limitando a acção destes no organismo em caso de reacção imune. Sabe-se que os linfócitos T auxiliares activam os linfócitos T supressores, que vão controlar os próprios linfócitos T auxiliares, impedindo que estes exerçam a sua actividade de forma excessiva. Os linfócitos T supressores também participam na chamada tolerância imunológica, que é o mecanismo utilizado pelo sistema imunitário para impedir que os leucócitos ataquem as próprias células do organismo. Portanto se houver deficiência na produção ou activação dos linfócitos T supressores, poderá ocorrer um ataque autoimune ao organismo. Os receptores de superfície encontrados no linfócitos T supressores são os CD3 e CD8, que também são encontrados nos linfócitos T citotóxicos (Nikoloch-Zugich et al., 2004).

Uma outra classe de linfócitos são as células Natural Killer (NK), possuem receptores CD16 à sua superfície, são linfócitos pouco específicos que tal com os linfócitos CD8 são citotóxicos, estão envolvidos na imunidade inata ou não específica destruindo células humanas e outras que apresentem sinais de invasão interna (Kindt et al, 2007; Abbas & Lichtman, 2003). Não se conhecem bem as suas funções.

## **1.2 Doenças autoimunes**

Durante muitos anos acreditou-se que a existência do sistema imunológico se justificava apenas pela necessidade de defesa. A própria palavra de raiz latina *Immunis* (livre de) já reflecte o conceito muito preciso de defesa contra agressão de agentes externos. A este conceito clássico seguiu-se o reconhecimento que a defesa podia dar lugar à agressão do próprio organismo, originando uma reacção autoimune em que o sistema imune não distingue o “próprio” do “não próprio” (Ferreira, 1998).

No início do século passado pensava-se que a tolerância ao próprio, ou seja, o estado de não autoimunidade, se devia à ausência de autoanticorpos ou de linfócitos que reagem contra o organismo e que a ocorrência destes era uma situação anormal e consequentemente geradora de doença. Paul Erlich (1904), um dos grandes defensores desta tese, utilizou para definir uma expressão que se celebrou – “Horror autotoxicus” (Avrameas, 1991). Segundo esta perspectiva o sistema imunológico tinha apenas como objectivo a defesa, e a presença de autoanticorpos era uma situação rara e, quando presente, patológica. No período subsequente e durante 60 anos, a Imunologia alicerçou nestas premissas os seus fundamentos, ou seja, o sistema imune existe com o objectivo de defesa e a presença de autoanticorpos é rara e anormal e, sempre que está presente, é patológica [<http://post.queensu.ca/~forsdyke/theorimm0.htm>].

No início da década de 1930, Landsteiner e colaboradores detectaram a existência, em indivíduos saudáveis, de anticorpos que reagem contra determinantes antigénicos do grupo sanguíneo ABO. Este achado de autoanticorpos não reactivos e não lesivos ficou sem explicação quanto à sua função e, praticamente, foi ignorado.

A ausência de autoagressão em condições fisiológicas era então justificada pela eliminação precoce dos linfócitos autorreactivos durante a vida fetal. Estes linfócitos, denominados de “clones proibidos”, seriam os responsáveis pelo aparecimento de situações patológicas de autoimunidade sempre que não eram eliminados. Assim, surgiu a “Teoria da Selecção Clonal” de Burnet (1959) em que a autotolerância era entendida como o resultado da eliminação destes clones (Burnet, 1959). Todavia, nos anos que se



seguiram, vários foram os factos que vieram contradizer esta teoria. Por exemplo, a existência em indivíduos saudáveis de autoanticorpos de vários tipos e a capacidade de linfócitos de humanos saudáveis produzirem autoanticorpos quando estimulados *in vitro* e *in vivo* (Avrameas et al, 1983).

Outro facto demonstrativo que o sistema imunológico possui linfócitos específicos com autorreactividade, é a possibilidade de induzir doença autoimune através da injeção de extractos de órgãos, como é o caso da tiroidite desencadeada pela vacinação com antitiroglobulina. Estes argumentos favoráveis à presença de clones autorreactivos, manifestada pela formação de autoanticorpos, foram então relacionados com a emergência de clones proibidos, por mutação ou por libertação de antígenos sequestrados. Aparece a “Teoria da Supressão Clonal”, segundo a qual não haveria eliminação mas supressão dos linfócitos autorreactivos e a falha desta supressão seria a responsável pela patologia autoimune (Burnet, 1959; Nossal, 1983).

Niels Jerne, em 1974 introduziu uma nova teoria para explicar a génese dos repertórios imunes, que abria a possibilidade teórica à existência de autorreactividades fisiológicas, a “Teoria da Rede do Sistema Imunológico”, baseada na selecção dos repertórios dos anticorpos, através de uma complexa rede de interacções idiotipo-anti-idiotipo. Este novo conceito postula que o sistema imunológico tem uma actividade autónoma, mesmo na ausência de estimulação externa. Daqui resulta que as autorreactividades encontradas não são necessariamente reacções autoimunes patológicas, mas consequências de um processo contínuo e constante de selecção do repertório dos anticorpos em situações fisiológicas normais. Deste modo, a acção deletéria destes anticorpos é contrariada, devido ao facto deles estarem incluídos numa rede altamente conectada, cheia de ligações, sendo a autoagressão controlada por neutralização mútua, não havendo lugar a autorreactividades patológicas. Cada anticorpo ao reagir especificamente com um grande número de outros anticorpos, forma uma rede complexa de idiotipo-anti-idiotipo, cuja multiplicidade de ligações é designada por conectividade. Quanto maior for o número de ligações num determinado clone, maior será o grau de conectividade e quanto maior for esta, menor será a possibilidade de autoagressão (Ferreira, 1998).

Esta nova forma de entender o sistema imunológico, confirmado posteriormente por outros autores, foi particularmente importante no que se refere à autoimunidade (Coutinho, 1984). Niels Jerne, ao afirmar que os repertórios imunológicos são

essencialmente autorreactivos, sem que autorreactividade seja sinónimo de autoagressão, considerou o problema de uma perspectiva totalmente contrária à interpretação feita por Erlich. Estava encontrada a explicação para a presença de anticorpos no sangue de indivíduos saudáveis que não tinham sido sujeitos a imunização prévia.

Depois de Landsteiner, outros investigadores reconheceriam a existência destes anticorpos, mas foi Boyden (1965) que pela primeira vez lhes deu a designação de autoanticorpos naturais (Avrameas et al, 1983).

Se o sistema imunológico, em condições fisiológicas, produz anticorpos que reconhecem as estruturas do próprio, como interpretar tal facto? Uma explicação poderia ser dada através dos primeiros conceitos imunológicos, ou seja, o sistema imune estaria organizado apenas para reconhecer de uma maneira muito específica os antígenos externos do meio ambiente e os autoanticorpos naturais seriam apenas um acessório, talvez até uma curiosidade. Outra forma de ponderar o problema seria considerar que se os autoanticorpos naturais existem, é porque são necessários, embora se possa discutir qual a sua utilidade, uma vez que foram preservados ao longo da evolução filogenética, muito provavelmente são apenas o reflexo de uma característica fundamental das células B. Nesta perspectiva o sistema imunológico não só reconhece antígenos do meio ambiente externo, como também do seu próprio meio interno, ou seja, da estrutura onde está integrado, ampliando-se desta forma o conceito funcional do próprio sistema. À luz deste novo conceito o sistema imune é fundamentalmente autorreactivo e a sua multirreactividade e conectividade permitem que a autorreactividade não tenha consequências patológicas. Deste modo, tornou-se limitado afirmar que o sistema imune ignora o próprio, ou que é activado apenas quando estimulado por antígenos estranhos ao seu meio interno, visto que no indivíduo normal ele reconhece, reage e é activado pelo seu próprio meio, sem que “reagir com” signifique “reagir contra” (Ferreira, 1998).

Os autoanticorpos naturais são anticorpos que reagem com estruturas do próprio organismo a que pertencem e são detectados no sangue de indivíduos saudáveis, quer animais quer da espécie humana, não necessitando para a sua síntese de estimulação antígenica ou mutagénica. Existem portanto naturalmente (Shoenfeld et al, 1989).

Poder-se-ia considerar que estes anticorpos naturais pudessem ter origem em infecções subclínicas ou até em antígenos desconhecidos, como sejam bactérias, vírus ou até

moléculas externas, transmitidas pelo ar ou através dos alimentos. Neste caso estaria subjacente o conceito de que o sistema imune existe exclusivamente para defesa, pronto a reagir contra moléculas estranhas e que é destituído de qualquer autorreactividade fisiológica e/ou de autonomia funcional. Contudo, trabalhos experimentais realizados em ratinhos a coberto de estimulação antigénica externa, vieram demonstrar que os anticorpos naturais resultam essencialmente de uma actividade interna do sistema imunológico. Assim, é consenso generalizado que os autoanticorpos naturais têm origem independentemente da estimulação antigénica exterior (Shoenfeld et al, 1989; Bandeira, 1988).

A designação de autoanticorpos naturais englobava o conceito primitivo de autorreactividade relacionada com estimulação antigénica desconhecida, detectada em indivíduos normais. Com o reconhecimento de que alguns destes anticorpos não reagem apenas com antígenos do próprio, mas também com antígenos estranhos, nomeadamente toxinas e bactérias, os autoanticorpos naturais passaram também a designar-se anticorpos naturais, não havendo na prática distinção nas duas nomenclaturas (Shoenfeld et al, 1989).

No homem, estes anticorpos estão continuamente a ser produzidos e secretados, sendo detectados em todos os grupos etários, com a particularidade dos seus níveis aumentarem com a idade. Os autoanticorpos anti-nucleares, anti-mitocondriais, anti músculo-liso, anti-tiroglobulina, são alguns exemplos destes anticorpos (Ferreira, 1998). Como principais características destes autoanticorpos naturais temos o facto de pertencerem ao isotipos IgG, IgM e IgA e constituírem uma parte importante das imunoglobulinas circulantes. Estudos, realizados em humanos e em modelos experimentais, demonstravam que os autoanticorpos naturais podem reagir com quase todos os antígenos do meio interno e incluem tanto os autoanticorpos associados às doenças autoimunes, (tal como os anticorpos anti-dsDNA) como outros sem qualquer ligação a estados patológicos (Jacob et al, 1986).

A maioria dos autoanticorpos naturais reconhecem os constituintes do organismo a que pertencem, são portanto autorreactivos. Além disso, quando testados em relação a um painel alargado de antígenos do “próprio” e do “não próprio”, são sobretudo polirreactivos, isto é, ligam-se a mais do que um antígeno. Esta propriedade foi observada tanto com anticorpos policlonais como com anticorpos monoclonais. Outro dos atributos interessantes dos anticorpos naturais é o de estarem conectados

idiotipicamente, considerando-se que há especificidade idiotípica quando o paratopo (é a porção da região variável da molécula de imunoglobulina, através da qual o anticorpo se vai ligar ao determinante antigénico ou epítopo) reconhece apenas um determinante antigénico.

Partindo deste pressuposto, Niels Jerne imaginou o sistema imunitário organizado em rede de idiotipos anti-idiotipos, ou seja, um sistema de idiotipo-anti-idiotipo de anticorpos dirigidos não só contra o antigénio exterior, mas também contra um outro anticorpo, através da ligação idiotipo-anti-idiotipo (Holmberg, et al, 1986).

Portanto, a conectividade consiste nas múltiplas e específicas interações entre as regiões variáveis (V) dos anticorpos e os dados experimentais, ao longo dos anos, tornaram evidente que os anticorpos naturais estão idiotipicamente conectados.

Estudos permitem afirmar que a existência dos autoanticorpos naturais, quer no homem quer nos animais, particularmente nos mamíferos, deve-se a uma autorreactividade fisiológica, conservada ao longo da filogenia através de uma linhagem de genes bem preservada. As suas características de polirreactividade fazem-nos interagir com vários componentes do organismo, nomeadamente células, receptores e até sistemas, e também com componentes estranhos ao próprio organismo, através de um sistema complexo. Desta forma, os autoanticorpos naturais participam na protecção do organismo contra os estímulos deletérios ambientais, contribuindo ainda para a manutenção da constância do meio interno, ou seja, da homeostasia.

A autorreactividade parece ser uma característica normal e fisiológica do sistema imunológico e, por isso mesmo, não é necessariamente considerada patológica .

Cada indivíduo possui um repertório de anticorpos naturais circulantes que resulta da selecção do repertório dos linfócitos B, cuja existência é independente dos estímulos externos a que o organismo está sujeito (Holmberg, et al, 1986; Ferreira, 1998).

Sendo a autorreactividade uma propriedade intrínseca do sistema imunitário, as doenças autoimunes poderão ser consideradas uma distorção dos mecanismos fisiológicos que asseguram o normal funcionamento do organismo. O facto dos anticorpos naturais reagirem com autoantigénios e de se terem encontrado autoanticorpos com idêntica especificidade e idiotipo em doenças autoimunes levou a que se pudesse considerar a autoimunidade patológica como resultado de alterações na produção dos autanticorpos naturais. Ainda que estas afirmações não estejam comprovadas para a generalidade das

doenças autoimunes, estão pelo menos demonstradas para algumas delas, de entre as quais se evidencia o lúpus eritematoso sistémico (Ferreira, 1998).

Dois mecanismos alternativos têm sido propostos para explicar a existência dos autoanticorpos nas doenças autoimunes, nomeadamente através da estimulação policlonal dos linfócitos B normais autorreactivos, resultando daí um aumento da sua concentração e o outro mecanismo seria através da indução, por um determinado antígeno, de um processo selectivo que condiciona uma mutação somática nos linfócitos B autorreactivos. Trabalhos experimentais têm vindo a corroborar estas duas hipóteses e vários autores têm apontado para a sua provável complementaridade (Craft et al., 1997).

O termo doença autoimune é aplicado a um largo espectro de doenças, que embora difiram na sua patologia têm muitos factores em comum, não se sabendo ainda se existe em todas elas um ou vários mecanismos comuns que concorrem para o mesmo fim.

É particularmente curioso o contraste entre a enorme avalanche de informação nesta área e a dificuldade em diagnosticar, prevenir e até tratar mais eficazmente estas doenças em particular o lúpus eritematoso sistémico (Ferreira, 1998).

### **1.3 Lúpus eritematoso sistémico**

#### **1.3.1 Perspectiva Histórica**

O termo lúpus (que em latim significa lobo) foi atribuído por *Roggerius* (Roggerio del Frugardi, cirurgião da Escola de Salerno) no século XIII para descrever lesões erosivas da face.

A palavra lúpus passou da linguagem vulgar para a literatura médica, graças às investigações históricas de Virchow. Em 1858, Cazenave, dividiu o lúpus em quatro entidades: 1) lúpus eritematoso, 2) lúpus tuberculoso, 3) lúpus ulcerante e 4) lúpus com hipertrofia. Moritz Kaposi (1837-1902) subdividiu o lúpus em formas discóides e formas disseminadas e introduziu o conceito de doença sistémica com um prognóstico potencialmente fatal. É controverso que Sir William Osler tivesse tido uma grande contribuição na descrição do lúpus sistémico. Entre 1895 e 1905 publicou 29 casos de doenças eritematosas tendo-se retrospectivamente, comprovado o lúpus sistémico em apenas duas mulheres (Dutschmann, 2006).

O ano de 1948 conduziu-nos à descoberta, por Hargraves, Richmond e Morton, das células LE, também conhecidas por células de Hargraves, em que os neutrófilos estão a

ser fagocitados por várias células em forma de roseta, (Bernard et al, 1976) tais células passaram a ser a assinatura biológica da doença. Decorridos dois anos Haserick demonstrou que a partir dos leucócitos de indivíduos normais se formavam células LE, *in vitro*, quando em presença dum soro de doente com lúpus. Nos anos 50 passaram a existir outros marcadores biológicos associados ao lúpus: o teste da sífilis falso positivo e o teste de imunofluorescência para anticorpos anti-nucleares. Quase simultaneamente, Pincus realizou testes de detecção dos anticorpos anti-DNA, outros marcadores da doença.

Eng Tan e Henry Kunkel, num doente chamado Smith, descobriram um anticorpo para uma glicoproteína, o anticorpo Sm, que, embora se encontre somente em 30% dos doentes com lúpus, tem grande especificidade. Após estes achados, revelaram-se muito mais anticorpos presentes na doença lúpica, mas dentro destes assumiu especial relevância a descoberta de Gordon Sharp de uma síndrome de sobreposição caracterizada por títulos elevados de anticorpo anti- ribonucleoproteína, conhecida inicialmente como Síndrome de Sharp, actualmente denominada como doença mista do conectivo (Dutschmann, 2006; Cordeiro, 1963).

Bernadino Antonio Gomes, em 1820, classificou o lúpus em 6 variedades. Setenta anos depois António Carlos Craveiro Lopes, na sua dissertação, alertou para a fotossensibilidade, predominância feminina, nefropatia e lesões articulares. Christovão Joaquim do Rosário Collaço, em 1907, separa claramente o lúpus vulgar do eritematoso e, dentro deste último, o simples (discóide) do generalizado agudo (sistémico). Em 1984, Humberto Costa e Arsénio Cordeiro publicam os resultados do seu trabalho experimental, abrangendo 18 doentes, no diagnóstico do lúpus eritematoso disseminado por imunofluorescência. Contudo pode-se dizer que a história é feita continuamente por pequenos passos contribuindo para um efeito comum (Dutschmann, 2006).

O Lúpus Eritematoso Sistémico (LES) é considerado o modelo de estudo por excelência das doenças auto-ímmunes sistémicas. Caracteriza-se pela presença de autoanticorpos dirigidos contra estruturas do próprio, sobretudo constituintes nucleares. Mecanismos deficientes de regulação imune levam ao aumento de células apoptóticas e de imunocomplexos contribuindo para o desenvolvimento do lúpus. A perda de imunotolerância, a carga antigénica aumentada, o excesso de células T auxiliares e preferência das células T auxiliares para a resposta Th2 conduz a uma hiperreactividade

das células B e à produção de autoanticorpos alguns dos quais patogénicos (Mok et al, 2003).

### 1.3.2 Manifestações clínicas e diagnóstico

O LES afecta directamente diversos órgãos, sendo o espectro das manifestações clínicas extremamente variado. Enquanto alguns pacientes apresentam apenas ligeiras lesões cutâneas e dores nas articulações, com remissão espontânea da doença, no outro extremo do espectro temos doentes que apresentam lesões progressivas de vários órgãos, necessitando terapia com doses elevadas de esteróides juntamente com outros fármacos citotóxicos (Kotzin, 1996).

A artrite e as artralguas são frequentemente as manifestações iniciais do LES e na maioria dos casos envolvem as pequenas articulações das mãos e dos punhos.

O LES afecta o sistema muco-cutâneo em 80-90% dos doentes com essa patologia; a fotossensibilidade, definida como “exantema cutâneo” em consequência de uma reacção não habitual à luz solar afecta cerca de dois terços dos doentes. O clássico exantema malar ou em borboleta (vespertílio) ocorre em 30% dos doentes e frequentemente este sintoma é acompanhado da presença de anticorpos anti-Ro/SSA, a alopecia difusa ou descontínua e a existência de cabelos curtos e facilmente friáveis surgem nos surtos de agudização do LES ou como consequência de efeitos colaterais dos medicamentos.

As úlceras da cavidade oral atingem cerca de 40% dos doentes e as manifestações neuropsiquiátricas aparecem em cerca de 60% dos doentes e podem atingir o sistema nervoso central e periférico ou ambos. A doença renal é frequente e pode ser a causa de morbilidade a longo-prazo, quase todos os doentes têm envolvimento renal no exame histopatológico, apesar da inexistência de doença clínica. O LES causa habitualmente uma glomerulonefrite mediada por imunocomplexos. A doença cardiovascular é uma complicação frequente e pode envolver todas as estruturas do coração, incluindo o pericárdio, válvulas, miocárdio e coronárias. A doença arterial das coronárias é uma causa importante de morbilidade e o enfarte do miocárdio é 50 vezes mais frequente nas mulheres com LES do que nas da mesma idade sem a doença. Assim, o rastreio dos factores de risco associados como a hipertensão arterial e a hiperlipidemia é fundamental. As manifestações mais frequentes de doença pulmonar no LES são pleurisia e a pneumonite aguda (Dall’Era & Davis, 2003 and 2004).

A maior parte dos doentes tem uma evolução com flutuações que compreendem exacerbações seguidas de períodos de relativa acalmia.

Para se caracterizar esta doença criaram-se uma série de critérios baseados num conjunto de dados clínicos e laboratoriais. O sistema de classificação mais utilizado actualmente consiste em 11 critérios criados pelo “American College of Rheumatology” – ACR e modificados em 1997, sendo, que para ser classificado como doente, o indivíduo tem de satisfazer pelo menos 4 destes critérios apresentados no anexo 1 (Tan et al, 1982).

Esta heterogeneidade fenotípica, característica das doenças complexas, constitui um dos grandes obstáculos não só à inequívoca caracterização do LES, como também à identificação dos factores de susceptibilidade, reflectindo o actual estado de ignorância relativamente a esta doença. Com efeito, pouco se sabe acerca dos seus mecanismos patogénicos ou sobre as suas origens.

### 1.3.3 Epidemiologia e origem

As estimativas da prevalência desta doença na população em geral variam entre os 12 e 64 casos por 100 000 indivíduos, em Portugal existem cerca de 7 500 – 10 000 doentes com LES. Trata-se de uma doença que afecta predominantemente mulheres (numa proporção de 1:9), sendo este desequilíbrio entre sexos mais significativo em idades compreendidas entre os 15 e 50 anos. Esta prevalência não é contudo homogénea nas diferentes populações, sendo 2 a 4 vezes superior em populações de origem não caucasiana quando comparada com a prevalência em populações caucasianas (Petri, 2002; Wakelandd et al, 2001). Tal como acontece com as restantes doenças auto-imunes, a sua prevalência tem vindo a aumentar (principalmente nos países mais desenvolvidos), ameaçando vir a tornar-se um problema de maiores dimensões.

Várias causas têm sido apontadas como estando na origem do lúpus, e por isso é dito que essa doença é multifactorial, em virtude de estarem envolvidos na sua patogenia vários factores nomeadamente hormonais, imunológicos, genéticos e ambientais (Mok et al, 2003; Wakelandd et al, 2001).

#### Factores Hormonais

As hormonas sexuais parecem desempenhar um papel importante como moduladores no aparecimento das doenças autoimunes em geral e no lúpus em particular. Tal como referido o lúpus afecta predominantemente as mulheres nos seus anos reprodutivos e com muita frequência a sua intensidade diminui na pós-menopausa. A actividade da doença flutua com o ciclo menstrual e com a gravidez, o que poderá indicar os estrógenos como possíveis imunomoduladores (Lahita, 1993). Experiências feitas em



animais mostraram que provavelmente os estrógenos aumentam a produção de anticorpos anti-DNA, dentre outras consequências. Várias células (monócitos, células T e outras) expressam receptores para os estrógenos que nestes doentes irão influenciar de algum modo as células do sistema imunitário (Inui et al, 2007). Estudos revelaram que um dos alvos da acção dos estrógenos seria a calcineurina, que é uma enzima que desempenha um papel muito importante na transdução de sinal das células T, resultando numa activação de interleucina-2 e de outras citocinas (Rider et al, 1998).

### Factores Imunológicos

Como tem sido amplamente descrito na literatura, um dos factores dominantes nos doentes com LES é a produção de elevados níveis de anticorpos contra uma grande variedade de antígenos, por parte dos linfócitos B autoreactivos (Kotzin, 1996).

Os autoanticorpos mais característicos nestes doentes são os anticorpos específicos para antígenos nucleares, genericamente designados por ANAs (*antinuclear antibodies*). Apesar da produção de anticorpos contra alvos nucleares não ser específica dos doentes com LES (cerca de 2% da população feminina com idade superior aos 40 anos apresenta esporadicamente níveis elevados de ANAs), existem certos antígenos nucleares para os quais é muito frequente a produção de autoanticorpos nesses doentes, sendo inclusivamente utilizados como critério de diagnóstico para o LES (Wakeland et al, 2001). O mais importante destes antígenos nucleares é a dupla cadeia de DNA (dsDNA). Outras proteínas que interagem directamente com o DNA, formando complexos ou participando nos processos de replicação ou transcrição, são também alvos específicos dos autoanticorpos produzidos no LES. É o caso das histonas e do complexo proteico Sm. Para além dos antígenos nucleares outros componentes celulares têm sido descritos como auto-antígenos associados ao LES, nomeadamente componentes citoplasmáticos e da membrana celular. A maior parte são proteínas que formam complexos com os ácidos nucleicos, como é o caso da proteína P ribossomal e das proteínas SSA/Ro (proteína que se associa a pequenos fragmentos de RNA citoplasmáticos) e o SSB/La (factor de terminação para a RNA polimerase III). Existem certamente outros antígenos contra os quais poderá haver produção de autoanticorpos, no entanto parece claro que certos autoanticorpos têm uma maior especificidade com determinadas patologias autoimunes (Wakeland et al, 2001).

É frequente observar elevadas concentrações de autoanticorpos em familiares não afectados, o que parece indicar a existência de factores genéticos responsáveis por esta

característica que estão a ser transmitidos nestas famílias (Lindqvist et al, 1999). Desta forma, a análise do padrão de reactividade para o conjunto de antígenos mais específicos do LES poderá ser utilizado como um endofenótipo imunológico associado à doença, já que sendo menos complexo que o próprio fenótipo da doença poderá ser mais facilmente estudado em termos genéticos.

A diversidade e o aumento dos linfócitos CD4 é necessário para gerar uma resposta das células B capaz de mediar o sistema autoimune (Busser et al., 2003)

Vários estudos demonstram que os linfócitos T reguladores, que são caracterizados pela expressão de CD4 e CD25, estão diminuídos nos doentes com lúpus (Crispin et al, 2003). As células T reguladoras são apenas 5% das células TCD4 (Takahashi et al, 2000), porém têm um papel extremamente importante no controlo da autorreactividade (Crispin et al, 2003), na manutenção da tolerância imunológica (Enredo, 2006; Sakaguchi, 2004) e na patogénese de doenças autoimunes (Crispin et al, 2004).

Admite-se que uma redução ou disfunção na população de células T reguladoras CD4+CD25+ podem ser responsáveis pelo aparecimento de doenças autoimunes (Hori et al, 2003).

Apesar do LES ser caracterizado pela activação policlonal de células B, e assim produção de autoanticorpos contra diversos antígenos, estudos mais recentes, mostram, que na verdade, o LES é uma doença dependente das células T. Parece haver uma disfunção intrínseca dos linfócitos T que por sua vez levará à disfunção do sistema imunológico humoral e celular, encontrada nesta patologia. Vários mecanismos originam alterações das células T, todos parecem levar a uma via comum e também a uma série de anormalidades secundárias nos linfócitos T tais como uma diminuição do número absoluto de linfócitos T circulantes (células T citotóxicas e T supressoras que normalmente inibem a resposta imune), alteração na proporção das células TCD4 e CD8, diminuição das células TCD8 supressoras (Maeda et al, 1999), diminuição na proliferação das células T em resposta a antígenos, aumento no número de marcadores de superfície como moléculas do MHC II (HLA- DR), activação policlonal de células B no estado inicial da doença e o aumento no nível sérico de interleucina – 2 (IL-2) do interferon- $\gamma$  e do factor de necrose tumoral em pacientes com doença activa (Kayser et al, 2003).

A interleucina – 2 é importante tanto para indução de apoptose de células T autoreactivas como na expansão e manutenção da função imunossupressora das células CD4+CD25+ (Crispin et al, 2004).

Sabe-se que os linfócitos T desempenham um papel fundamental na manutenção da homeostasia do sistema imunitário, controlando não só a produção de anticorpos pelos linfócitos B como também a função das células T citotóxicas (Janeway et al, 1999). A tolerância é mantida em grande parte devido a uma correcta comunicação entre as células T e B, o principal mecanismo de manutenção dessa tolerância é o processo de selecção negativa que ocorre no timo, porém estudos demonstraram que existem outros mecanismos e factores genéticos que influenciam o controlo de autoreactividade característico das doenças autoimunes (Crispin et al, 2004).

Alguns estudos mostram que os linfócitos de doentes com lúpus apresentam uma taxa de apoptose (morte celular programada) superior à de indivíduos saudáveis ou com outras doenças autoimunes, e que durante o processo de apoptose há libertação de nucleossomas. Isso poderá explicar o facto dos níveis de nucleossomas (dsDNA e histonas) estarem aumentados nos soros dos doentes com LES em relação aos indivíduos saudáveis. Porém os nucleossomas por si só não são imunogénicos, e como tal não há concretamente uma explicação para a produção dos anticorpos anti-DNA, alguns dos estudos realizados consideram que a estrutura e a dinâmica dos nucleossomas juntamente com a apoptose aumentada são fundamentais na determinação da imunogenicidade no LES (Emlen et al, 1994; Huck et al, 1999).

Os anticorpos anti-DNA mostram uma deposição preferencial ao nível renal, sugerindo que os complexos DNA – anticorpos anti-DNA são os principais mediadores da inflamação. A ligação dos anticorpos anti-DNA a outros antigénios (fragmentos de DNA aderentes a membrana basal glomerular) pode iniciar um processo de inflamação local e a activação do complemento levando a deposição de imunocomplexos circulantes no rim (Chen, 2007).

Autores admitem existir uma correlação entre a presença de anticorpos anti-DNA de cadeia dupla e a actividade da doença (Saisson et al, 2006; Benucci et al, 2003).

O sistema do complemento é considerado um dos principais mediadores humorais da inflamação, sendo estabelecido que a activação do complemento desempenha um papel importante na patogénese do LES relacionando-se com a actividade da doença (Reason, 2002). A presença de concentrações reduzidas de C3 e C4 em pacientes com títulos

elevados de anticorpos anti-nucleares (ANA) pode indicar uma maior actividade da doença especialmente a nível renal e hematológico (Saisoong et al, 2006).

Contudo os níveis de complemento podem ser enganadoramente baixos no subgrupo de doentes com LES que tenham deficiências hereditárias do complemento (Ho et al, 2001).

A proteína C reactiva (PCR) é uma  $\beta$  – globulina produzida no fígado. A dosagem desta proteína é principalmente utilizada para monitorizar a resposta de fase aguda, sendo considerada uma das mais sensíveis por apresentar um tempo de meia vida curto (8-12 horas), é um activador da via clássica do complemento, pode iniciar processos de fagocitose e lise de células invasoras antes mesmo da produção de IgM e IgG.

Em estados inflamatórios crónicos, como nos doentes com LES, as concentrações de PCR podem persistir altas indefinidamente (Wallach, 2002).

#### Factores Genéticos e Ambientais

Uma equipa de investigação, do Instituto Gulbenkian de Ciência (IGC), ao tentar identificar os factores genéticos de susceptibilidade ao lúpus, descobriu que os indivíduos com esta doença possuem menos quantidade de um determinado tipo de células do sistema imune – os chamados linfócitos T reguladores, estes linfócitos mantêm sob controlo os linfócitos T autorreactivos, que atacam ou conduzem ao ataque das células do próprio organismo. Como já foi referido neste trabalho, vários autores relacionam este grupo de células a patogenese desta doença.

Foi demonstrado por essa equipa da IGC que mesmo entre os indivíduos saudáveis, os linfócitos T reguladores são mais abundantes entre os homens do que entre as mulheres, o que pode explicar, pelo menos em parte, por que razão o lúpus é mais comum nas mulheres do que nos homens. Para além disso, verificaram que o número destes linfócitos se encontra sob controlo genético e, por isso, compararam as mesmas regiões genéticas de doentes e seus familiares, para tentar identificar pequenas modificações no genoma. Encontraram duas variantes em 2 genes específicos que parecem ser importantes para o bom funcionamento destas células. E assim se completa a cadeia: sinais patológicos, derivados de comportamentos celulares alterados, que resultam, por sua vez, de modificações genéticas (Barreto, 2004 e 2005).

Esta descrito que o factor de transcrição FoxP3 é essencial ao desenvolvimento e actividade supressora e controlo da expressão de CD25 nas células T reguladoras (Lyssuk et al, 2007). Há evidências que o gene Cytotoxic do Antígeno 4 do linfócito T

(CTLA 4) desempenha um papel relevante na patogenese do Lúpus e de outras doenças autoimunes (Barreto, 2004; Takashashi et al, 2000).

Estudos em humanos revelaram que a susceptibilidade ao LES envolve genes do sistema HLA (*Human leucocyte antigen*) da classe II. Existe uma associação do HLA DR2 e DR3 relativamente ao risco de desenvolver a doença em aproximadamente 2 para 5. Os genes da classe II também estão envolvidos com a presença de certos autoanticorpos tais como anti-Sm, anti-SSA/Ro, anti-SSB/La, anti-RNP e anti-DNA (Brian, 1996; Mok, et al 2006).

Pelo facto de existirem estas modificações ao nível do genoma não significa que se venha a manifestar lúpus, o que poderia acontecer em interacção com outras modificações ainda por identificar, juntamente com factores ambientais.

A hereditariedade de características multifactoriais tais como a susceptibilidade ao LES tem sido explicada através de um modelo proposto por Wanstrat & Wakelandd, este modelo admite que um indivíduo desenvolverá doença quando o risco exceder um determinado limite. Este risco é determinado pelo conteúdo em genes de susceptibilidade acumulado que é modificado pela exposição ambiental e ou exposições ocasionais do indivíduo ao longo da vida (Wakelandd et al, 2001).

#### 1.3.4 Actividade da doença

A actividade da doença pode ser definida com base nas manifestações reversíveis do processo inflamatório subjacente. Envolve a presença de novos sintomas ou sinais de envolvimento de um órgão ou agravamento do sistema orgânico já afectado, o que se reflecte no aumento da actividade da doença [<http://www.fda.gov/CDER/guidance>].

A procura de parâmetros específicos para definir a actividade e consequente gravidade da doença é um constante estímulo para a pesquisa de marcadores que indiquem actividade clínica do LES. Foram elaborados vários sistemas de critérios de actividade para descrever a presença ou ausência da actividade lúpica avaliada por manifestações gerais como as que afectam órgãos mais relevantes, sendo os mais utilizados: o SLEDAI (*Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index*), SLAM (*Systemic Lupus Activity Measures*), BILAG (*British Isles Lupus Assessment Group*), SLICC /ACR (*Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatologists*) e LAI (*Lupus Activity Index*). No entanto continuam a ser testados, tal como têm sido propostos, vários marcadores serológicos para o acompanhamento destes

pacientes, porém foram considerados por alguns autores pouco específicos na avaliação da actividade da doença (Strand et al, 1999; Bombardier et al, 1992).

O índice SLEDAI apresenta-se como um formulário com 24 itens cujas definições se encontram ao lado dos itens (Anexo 2). Aqueles que estão presentes são anotados na coluna da pontuação e o total é calculado pela soma dos pontos. A pontuação oscila de 0 ao 105, e os itens que recebem mais pontos são os relacionados com o sistema nervoso central (Bombardier et al, 1992; Ibañez et al, 2007).

Foram escolhidas 24 variáveis por grau de importância dentre 37 inicialmente propostas a vários clínicos com a intenção de definir actividade. As manifestações constantes do índice devem estar presentes nos 10 dias que precedem a avaliação. Os itens constantes do SLEDAI com suas respectivas pontuações são: convulsões (8), psicose (8), síndrome cerebral orgânico (8), distúrbios na visão (8), alterações nos nervos cranianos (8), cefaleia do LES (8), acidente vascular cerebral (8), vasculite (8), artrite (4), miosite (4), cilindros urinários (4), hematuria (4), proteinúria (4), piúria (4), rash cutâneo (2), alopecia (2), úlceras mucosas (2), pleuresia (2), pericardite (2), déficit do complemento (2), anticorpos-anti-DNA (2), febre (1), trombocitopenia (1), leucopenia (1), que reflectem 9 sistemas de órgãos. A pontuação é feita em função da presença (1-8) / ausência (0) em 5 categorias: SLEDAI = 0 sem actividade; SLEDAI = 1-5 pouca actividade; SLEDAI = 6-10 actividade moderada; SLEDAI = 11-19 alta actividade; SLEDAI = 20 muito alta actividade (Mosca et al, 2006).

O índice SLAM é calculado não apenas em função da presença ou ausência das manifestações mas com o período de tempo da manifestação ou a frequência no mês anterior ao da avaliação, registando o grau mais grave presente durante esses períodos. Este índice compreende a classificação em 31 itens: manifestações cutâneas (rash malar, alopecia, úlceras orais e outros), manifestações gerais (perda de peso, febre), ao nível do sistema reticuloendotelial (esplenomegalia, linfadenopatias), alterações ao nível pulmonar e gastrointestinal, alterações ao nível cardiovascular (fenómeno de Raynaud entre outros), alterações ao nível neuromotor e ainda ao nível pulmonar, artrite, exames laboratoriais e outros. Cada um desses itens é classificado em função da ausência (0) / presença fraca (1) / presença moderada (2) / presença severa (3). A pontuação varia de 0 a 86 [[www.rheumatology.org/publications/classification/SLE/sle.asp?aud=men](http://www.rheumatology.org/publications/classification/SLE/sle.asp?aud=men)].

O índice BILAG baseia-se na necessidade para alterar ou intensificar a terapêutica e compreende 86 perguntas, algumas baseadas na história do doente, outros em dados

clínicos e ainda em alguns resultados laboratoriais. A classificação envolve 5 categorias designadas pelas letras A até E. A categoria A corresponde a um grau de doença activa com lesões graves que requer tratamento urgente e modificação na terapêutica (9 pontos), a categoria B corresponde a um grau de doença menos activa em que as lesões são menos graves ou mesmo reversíveis, pode implicar modificações menores no tratamento, com manutenção, mas não instituição, de esquemas terapêuticos novos e mais agressivos (3 pontos), a categoria C indica o envolvimento de um sistema mas com menor gravidade do que nas categorias anteriores (1 ponto), a categoria D corresponde ao envolvimento de um sistema mas que já foi tratado, portanto sem alterações laboratoriais ou sem sintomas e por fim a categoria E em que não houve envolvimento de nenhum sistema (Gordon et al, 2003).

O índice SLICC /ACR foi proposto pelo “American College of Rheumatology”, e mede o dano do órgão acumulado, resultante da própria doença, como das suas complicações ou dos fármacos empregues no seu tratamento. Considera dano as alterações que persistem pelo menos 6 meses, esse dano é avaliado clinicamente em dano não reversível e não relacionado com a inflamação activa e em presença do dano durante pelo menos 6 meses sendo que episódios repetidos devem ocorrer num intervalo de pelo menos 6 meses para que a mesma lesão não seja cotada duas vezes. Este índice é calculado pelo somatório das cotações individuais (cotam-se determinadas ocorrências com 1 ponto ou em casos excepcionais 2-3 pontos) em 12 sistemas/ órgãos: pele, musculoesquelético, gastrointestinal, renal, sistema nervoso central, ocular, cardiovascular, hormonal, diabetes mellitus, neoplasias e pulmonar. Contagens elevadas nos índices de dano são preditivos de mortalidade aumentada (Stoll et al, 1996).

O índice LAI é constituído por 5 partes. A parte I avalia a actividade global da doença pelo médico em escala analógica visual (VAS) com pontuação que varia de 0 a 3; a parte II é uma análise de 4 sintomas (fadiga, rash, artrite, serosite) em escala (VAS) de 0 a 3 pontos, a parte III avalia a actividade em quatro sistemas orgânicos (neurológico, renal, pulmonar, hematológico) em escala de 0 a 3 e a parte IV envolve a medicação em uso, com diferentes pontuações, de acordo com a fármaco e a dose utilizadas, a parte V atribui pontos a três parâmetros laboratoriais: proteinúria, anticorpos anti-DNA e C3, C4 ou CH50. A pontuação final é o resultado de combinações de médias aritméticas dessas cinco partes. As avaliações incluídas devem ter ocorrido nas duas semanas que antecedem a avaliação, e a pontuação final varia de 0 a 3.

Na prática clínica esses índices de actividade permitem quantificar as variações da actividade da doença no mesmo paciente e avaliar a resposta ao tratamento [www.sbn.org.br].



## **2 OBJECTIVOS**

O trabalho realizado pretende estabelecer uma relação entre os valores das populações linfocitárias e a actividade da doença em pacientes com Lúpus Eritematoso Sistémico.

Com o objectivo de avaliar a actividade da doença foram determinados os factores C3 e C4 do complemento e fez-se a pesquisa de autoanticorpos, para além duma análise aos sintomas clínicos referidos nas fichas dos pacientes. Com base no índice SLEDAI os pacientes foram classificados quanto a actividade da doença e caracterizados ao nível da imunologia celular através da determinação das populações linfocitárias. Deste modo tentou-se verificar a variação das populações linfocitárias em função dos graus de actividade considerados.

Outro objectivo do estudo em que se insere este trabalho foi o de verificar a influência da terapêutica administrada nos valores das populações linfocitárias bem como na actividade da doença.

Com o objectivo de analisar os valores do grupo de pacientes com LES no que respeita aos parâmetros analisados, fez-se a comparação com um grupo controlo.

### **3 AMOSTRAS E MÉTODOS**

#### **3.1 Grupos de estudo**

Este estudo incidiu sobre um grupo de vinte e três doentes da Associação de doentes com lúpus e treze provenientes da consulta de medicina II do Hospital Fernando Fonseca-Lisboa sob orientação do Dr Luís Afonso Dutschmann.

Trinta e cinco eram do sexo feminino e um do sexo masculino, com idades compreendidas entre os 20 e 66 anos, com uma média de  $42 \pm 12$  anos. Três dos doentes eram de origem africana (8,3%) e os restantes de origem europeia (91,7%).

A cada indivíduo da população em estudo, pacientes com LES, foi explicado o objectivo do trabalho, tendo-se obtido de todos eles autorização (consentimento informado) para a realização do estudo.

O grupo de controlo foi constituído por voluntários, que frequentaram o Laboratório Imunonuclear para fazerem análises de rotina, aparentemente saudáveis, sem conhecimento de algum familiar com doenças autoimunes e sem qualquer terapêutica. Foram assim seleccionados trinta e um indivíduos para o grupo controlo dando-se preferência à população feminina e de um grupo etário pré-menopausa.

Deste grupo de trinta e um controlos, vinte e sete eram do sexo feminino e três do sexo masculino, com idades compreendidas entre os 22 e os 50 anos, com uma média de  $34 \pm 7$  anos. Todos os constituintes do grupo controlo eram de origem europeia.

#### **3.2 Metodologias utilizadas**

##### **3.2.1 Obtenção e Preparação das Amostras**

De cada um dos participantes de ambos os grupos (grupo de pacientes com LES e grupo de controlo), foi colhida uma amostra de sangue total por punção venosa em um tubo estéril com K<sub>4</sub>EDTA (2,7ml) para determinação das populações linfocitárias. O sangue obtido foi processado num período de 24 horas no citómetro de fluxo.

Para a pesquisa de autoanticorpos, doseamento da Proteína C Reactiva e das fracções C3 e C4 do complemento foram recolhidos cerca de 2,6 ml de sangue para um tubo seco a fim de obter o soro após centrifugação a 3000 rpm durante 15 minutos. As amostras foram armazenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  até serem utilizadas.

### 3.2.2 Citometria de Fluxo

A Citometria de Fluxo é basicamente um método analítico que permite a medição rápida de certas características físicas e químicas de células ou partículas em suspensão num líquido que produz um sinal ao interagir com uma fonte de luz.

O princípio em que se baseia esta tecnologia é simples: fazer passar células ou outras partículas em suspensão alinhadas uma a uma diante de um raio luminoso. A informação produzida pode agrupar-se em dois tipos fundamentais: a geral para a dispersão da luz e a relacionada com a emissão de luz pelos fluorocromos presentes nas células ao serem excitadas pelo raio luminoso. Os sinais luminosos detectados transformam-se em impulsos eléctricos que se amplificam e convertem em sinais digitais que são processados por um computador (Ramírez, 2004).

Para que se possa analisar células ou partículas num citómetro de fluxo é necessário que estas estejam em suspensão num líquido. Este é geralmente um tampão que se encontra num reservatório que está pressurizado. A pressão empurra o tampão até a câmara de fluxo. A composição do tampão depende do tipo de células ou partículas a analisar, sendo para os leucócitos uma solução tampão salina.

Também a amostra é pressurizada, as células são assim injectadas no centro da corrente de tampão na câmara de fluxo e permanecerá sempre no centro à medida que flui através da zona de análise, que se denomina foco hidrodinâmico. O exacto diâmetro da zona central onde passam as células depende essencialmente da velocidade a que a amostra é injectada na corrente. Mantendo-se o foco hidrodinâmico, faz-se a análise de cada célula individualmente. Alterações na velocidade da amostra provocam alterações no diâmetro do centro do fluxo. Quando este aumenta, as células /ou partículas não permanecem no centro quando atingem o ponto de análise e a iluminação não é uniforme.

A iluminação das células ou partículas é feita por uma luz laser, geralmente de Árgon, (e um outro laser de Hélio) esta luz é monocromática e coerentemente estável quer na direcção quer na intensidade, o feixe de luz intenso e estreito é focado por uma lente de modo a iluminar uniformemente as células em suspensão. O ponto de intercepção da luz com a célula é o ponto de análise, à volta deste ponto encontram-se várias lentes e filtros que recolhem e focam a luz dispersa e reflectida em todas as direcções, essa luz é captada por fotodetectores.

O feixe de radiação de excitação ao interceptar a partícula (célula) na câmara, sofre dispersão quer na direcção frontal (forward scatter -FSC), quer lateral (side scatter-SSC). A radiação assim dispersa é detectada directamente por fotodiodos (dispersão frontal) ou pode ser desviada a 90° por lentes, espelhos dicróicos e filtros ópticos e focada em fotomultiplicadores. A combinação deste tipo de radiação dispersa revela informações importantes tais como a dimensão celular e a granularidade/complexidade. A dispersão frontal é interpretada como uma medida do tamanho relativo e a dispersão lateral como uma medida da complexidade relativa da célula analisada (Ramírez, 2004). Adicionalmente à separação com base nas características morfológicas é possível utilizar uma variedade de moléculas fluorescentes, os fluorcromos, que causam a emissão de luz secundária a um comprimento de onda diferente. A detecção deste segundo comprimento de onda é usada para quantificação ou medição da presença do marcador celular.

Os citómetros utilizados neste trabalho para a determinação de percentagens e valores absolutos de subpopulações de linfócitos humanos no sangue total são da marca Becton Dickinson e do modelo FACS Calibur<sup>tm</sup> equipados com dois lasers de 635 e 488nm podendo detectar a difração da luz e a fluorescência quadricolor com 5 fotomultiplicadores (um para dispersão lateral e quatro para fluorescências).

Os sinais luminosos, amplificados e convertidos em pulsos eléctricos pelos detectores, são então medidos e sofrem uma conversão analógica-digital. Os sinais digitalizados são processados por analisadores em vários canais, de tal modo que é possível ir acumulando os sinais em tempo real (sob a forma de histogramas mono ou biparamétricos que são visualizados no monitor do computador) e portanto verificando simultaneamente, as distribuições dos valores da frequência e /ou intensidade, de cada parâmetro celular. Ao citómetro está acoplado um computador Macintosh, com software Multiset que permite distinguir os tipos celulares do sangue periférico em três subpopulações distintas: granulócitos, monócitos e linfócitos devido as suas diferenças físicas e caracterizar a população de interesse utilizando os fluorcromos.

#### Populações linfocitárias

A fim de melhor compreender a metodologia utilizada neste estudo para identificar as diferentes subpopulações linfocitárias fez-se uma pequena descrição de cada grupo de diferenciação (Quadro1).

## Caracterização das Populações Linfocitárias em pacientes com Lúpus Eritematoso Sistémico, e sua relação com a actividade da doença

Quadro 1 - Características dos grupos de diferenciação (CD = *cluster of differentiation*)

Antígeno CD	Expressão celular	Peso Molecular	Funções	Outros Nomes	Família
<b>CD3</b>	Timócitos, células T	45	Asociado al TCR	T3	Inmunoglobulina
<b>CD4</b>	Timócitos, células Th1 y Th2, monocitos, macrófagos	55	Correceptor de MHC II. Receptor para gp120	T4, L3T4	Inmunoglobulina
<b>CD8</b>	Timócitos, células T citotóxicas	66	Correceptor de MHC I	T8, Lyt2,3	Inmunoglobulina
<b>CD16</b>	Neutrófilos, células NK, macrófagos	50-80	Componente del receptor de baja afinidad para Fc	Fc $\gamma$ RIII	Inmunoglobulina
<b>CD19</b>	Células B	95	Correceptor de células B, junto con CD21 y CD81		Inmunoglobulina
<b>CD45</b>	Todas las células hematopoyéticas	180-240	Fosfatasa de tirosina	LCA, T200, B220	Fibronectina tipo III
<b>CD56</b>	Células NK, linfocitos T	135-220	Molécula de adhesión	NKH-1	Inmunoglobulina

(Modificado de Almuzara et al, 2006)

Para a caracterização das populações linfocitárias foi utilizado o kit MultiTEST IMK com 2 reactivos de imunofluorescência directa com 4 cores, em que o primeiro reactivo- CD3/CD8/CD45/CD4 - contém anticorpo anti-CD3 marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC-verde), anticorpo anti-CD8 marcado com ficoeritrina (PE-laranja), anticorpo anti-CD45 marcado com a proteína peridina clorofila (PerCP- roxo) e o anticorpo anti-CD4 marcado com alofocianina (APC- azul-violeta). O segundo reactivo - CD3/CD16+CD56/CD45/CD19 - contém anticorpo anti-CD3 marcado com FITC, anticorpo anti- CD16 marcado com PE, o CD45 marcado com PerCP e o CD19 marcado com APC.

O CD3 identifica os linfócitos T e reconhece o receptor do antígeno da célula T (TCR). O anticorpo CD4 identifica os linfócitos T auxiliares e reconhece o antígeno CD4, o qual interacciona com as moléculas da classe II do complexo maior de histocompatibilidade (MHC). O CD8 identifica os linfócitos T supressores/ citotóxicos, a molécula CD8 interacciona com as moléculas da classe I do MHC o que resulta em um aumento da adesão entre os linfócitos TCD8 e os leucócitos. A união da molécula CD8 e das moléculas da classe I do MHC aumenta a activação dos linfócitos em repouso.

Os CD16 conjuntamente com CD56 facilitam a identificação da população de linfócitos Natural Killer (NK). O anticorpo monoclonal anti-CD19 identifica os linfócitos B, está presente em todas as fases de maturação dos linfócitos humanos B. É possível que o antígeno CD19 participe na activação e proliferação dos linfócitos B. O CD45 identifica os leucócitos. Na figura 3 estão representados alguns destes marcadores celulares.

A solução de lise utilizada para lisar os eritrócitos contém 15% de formaldeído e 50% de dietilenoglicol. Os tubos TruCount contêm um sedimento seco por congelação de microesferas fluorescentes, quando utilizados na aquisição das amostras permitem o cálculo de valores absolutos. São utilizadas microesferas CaliBrite™ e o Software FACSCComp™, versão 4.0 para configurar as voltagens do tubo fotomultiplicador, a compensação entre fluorescências e verificar a sensibilidade do instrumento antes de utiliza-lo com o Kit MultiTest IMK. Com o software Multiset podemos caracterizar as populações de interesse para este estudo nomeadamente os linfócitos T (CD3+) e as suas subpopulações os linfócitos T helper (CD4 +/CD3+), os linfócitos T citotóxicos (CD8+/ CD3+), os linfócitos B (CD19+) e os Natural Killer (CD16+) (Nicholson, et al, 1993; Goldsby et al., 2003).

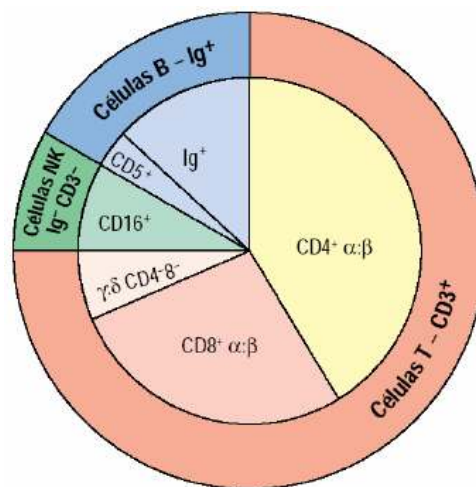


Figura 3 - Distribuição das subpopulações linfocitárias com os respectivos marcadores celulares  
(Almuzara et al, 2006)

### 3.2.3 Imunofluorescência Indirecta

A imunofluorescência indirecta (IFI) é o método tradicional para screening dos autoanticorpos, esta técnica foi adaptada para a pesquisa de autoanticorpos em 1957, por Fries, em que um anticorpo fluorescente serve de marcador da reacção antígeno-anticorpo que se produz à superfície de um substrato.

Os autoanticorpos presentes na amostra a testar ligam-se ao antígeno homólogo do substrato, uma lavagem elimina o excesso de soro do substrato. Um antisoro conjugado fluorescente, junta-se ao substrato, e liga-se ao autoanticorpo fixado. Depois de uma segunda lavagem para eliminar o excesso do conjugado, é adicionado ao substrato uma

gota de meio de montagem e coberto por um lamela sendo posteriormente observado ao microscópio de fluorescência (Figura 4). A presença de um aspecto específico da fluorescência sobre o substrato indica a presença de autoanticorpos na amostra.

Para a pesquisa de anticorpos anti- nucleares (ANA) o substrato escolhido são as células epiteliais humanas em cultura, designadas por Hep-2 (células originadas de carcinoma laríngeo humano que crescem em monocamadas sob lâminas de vidro) por diversas razões: núcleos grandes, grande sensibilidade, várias células nos diferentes estádios de mitose permitindo a detecção de anticorpos contra antígenos que apenas são expressos durante o ciclo celular.

O conjugado utilizado para a pesquisa de anticorpos anti-nucleares (ANA) que são frequentemente da classe IgG à excepção dos anti-DNA e anti-histonas que são normalmente do tipo IgM, é uma anti-imunoglobulina marcada com isotiocianato de fluoresceína (FITC) que pode ser polivalente, (dirigida contra todas as classes de Imunoglobulinas) ou ser monoespecífica, dirigida contra uma das classes de IgA, IgG ou IgM. As amostras são diluídas em Tampão Fosfato Salino (PBS) (Humbel, 1994).

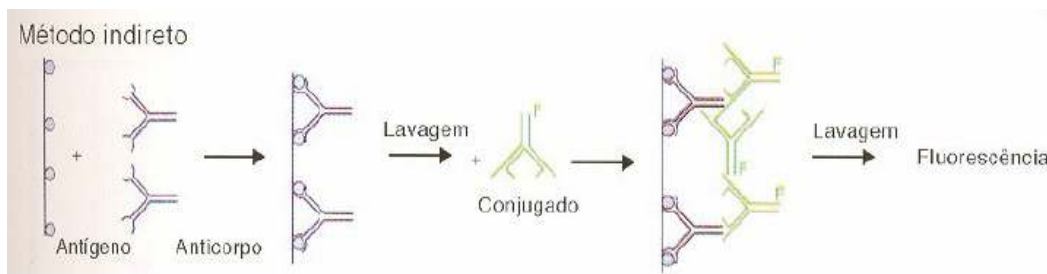


Figura 4 - Método de Imunofluorescência Indirecta –IFI (Técnicas Imunológicas)

A IFI sobre as células Hep-2 constitui a etapa inicial indispensável para a pesquisa de ANAs. É em função dos resultados obtidos com este primeiro teste que orientamos o nosso estudo escolhendo outras técnicas para fazermos uma identificação precisa do tipo de anticorpo. Um grande número de anticorpos anti-nucleares e anti-citoplasmáticos podem ser identificados nas células Hep-2. É o aspecto da fluorescência que permite identificá-los. Em alguns casos, o aspecto é suficiente evocador para que possamos deduzir directamente a natureza do anticorpo. Noutros as imagens evocam um tipo de anticorpos, que permite orientar para posteriores exames complementares para sua identificação definitiva. Na presença de anticorpos anti-nucleares (consideram-se positivo títulos superiores 1/160) convém procurar sistematicamente os anticorpos que

reagem com os constituintes nucleares solúveis denominados ENA (*Extractable Nuclear Antigens*). Em síntese é descrito, na Figura 5, como se procede na detecção de autoanticorpos característicos do LES e de outras doenças autoimunes.

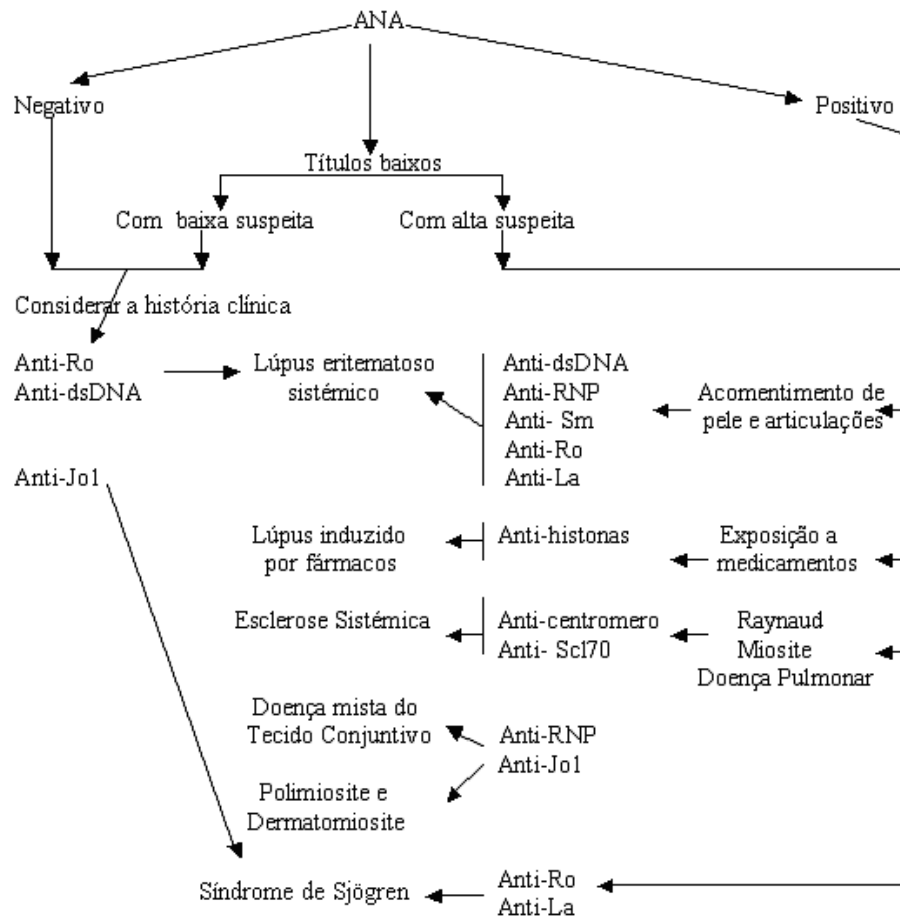


Figura 5 - Relação dos anticorpos anti-nucleares (ANA) e determinadas patologias autoimunes (Adaptado de Humbell, 1994)

Esta pesquisa pode ser feita por diferentes métodos: imunoprecipitação em gel, ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) ou por Immunoblotting.

A classificação das ANAs pode ser vista sob três aspectos:

- Imagem característica obtida pela fluorescência sobre as células Hep-2,
- Natureza do antígeno reconhecido,
- Tipo de conectividade ao qual ele está frequentemente associado.

As formas de denominação desses anticorpos podem ser baseados: na abreviatura do nome do primeiro doente (Sm para Smith), na natureza da infecção em que são encontrados (Scl para escleroderme) e natureza química do antígeno.



O aspecto homogéneo (Figura 6) caracteriza-se por uma fluorescência uniforme nas células, corresponde a expressão morfológica dos anticorpos anti-histonas e anti-nucleoproteínas (dsDNA, ssDNA). Ocorrem em pacientes com LES mas também em outras patologias tais como a artrite reumatóide, síndrome de Sjögren e o lúpus induzido por fármacos (Goulvestre, 2006).

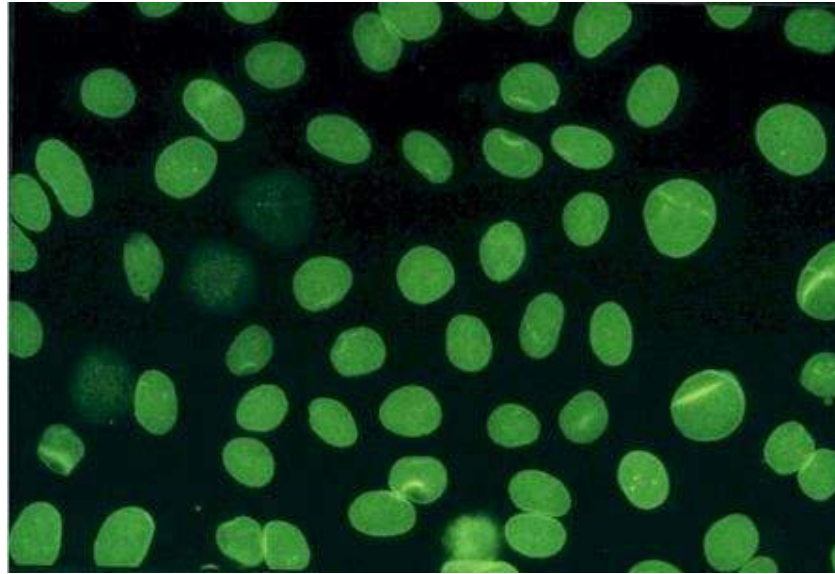


Figura 6 – Aspecto Homogéneo das células Hep-2 ([www.labodia.com/en7ana/Atlas/anaatlasnuclear.htm](http://www.labodia.com/en7ana/Atlas/anaatlasnuclear.htm))

O aspecto mosqueado (Figura 7) tem uma interpretação mais complexa e está correlacionado com anticorpos contra antígenos extraídos do núcleo (ENA) sendo encontrados em muitas doenças autoimunes. O mosqueado fino relaciona-se com a presença de anticorpos anti – SSA/Ro, anti – SSB/La e outros, enquanto o mosqueado grosso sugere a presença de anticorpos anti – Sm e anti – RNP.

O anticorpo anti-Sm é um marcador altamente específico dos doentes com lúpus, visto não ter sido detectado nem em soros de pacientes normais nem em soros de pacientes que desenvolvem uma artrite reumatóide.

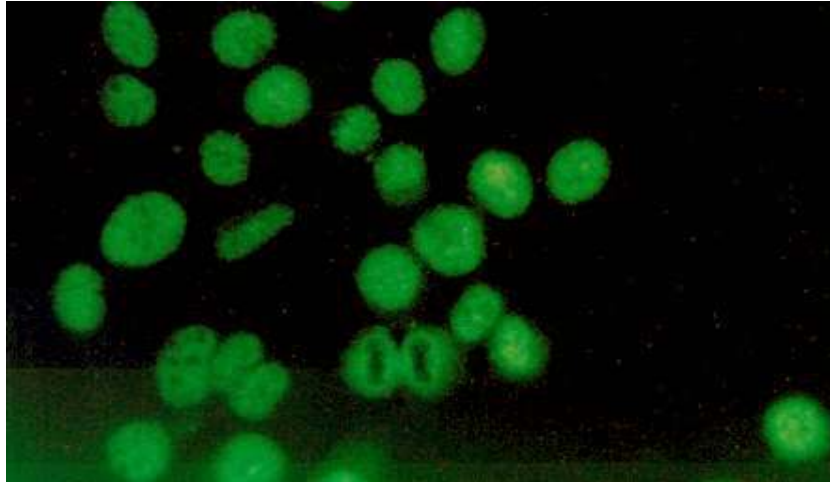


Figura 7 – Aspecto Mosqueado das células Hep-2 ([www.labodia.com/en7ana/Atlas/anaatlasnuclear.htm](http://www.labodia.com/en7ana/Atlas/anaatlasnuclear.htm))

O aspecto periférico (Figura 8) é particularmente evocador da presença de anticorpos anti- DNA de cadeia dupla (dsDNA), nesse caso deverá ser feita a pesquisa por outro método ou por IFI com um substrato mais específico para a pesquisa desses autoanticorpos. Geralmente é utilizado a *Crithidia lucillae* que é um hemoflagelado que possui uma mitocôndria gigante que contém uma massa de dsDNA circular muito condensada. Essa massa de DNA, conhecida como cinetoplasto, parece ser livre de histonas ou de quaisquer outros antígenos nucleares de mamíferos. A principal vantagem do teste de dsDNA usando a *Crithidia lucillae* é a sua grande especificidade, devido à natureza do dsDNA circular no cinetoplasto.

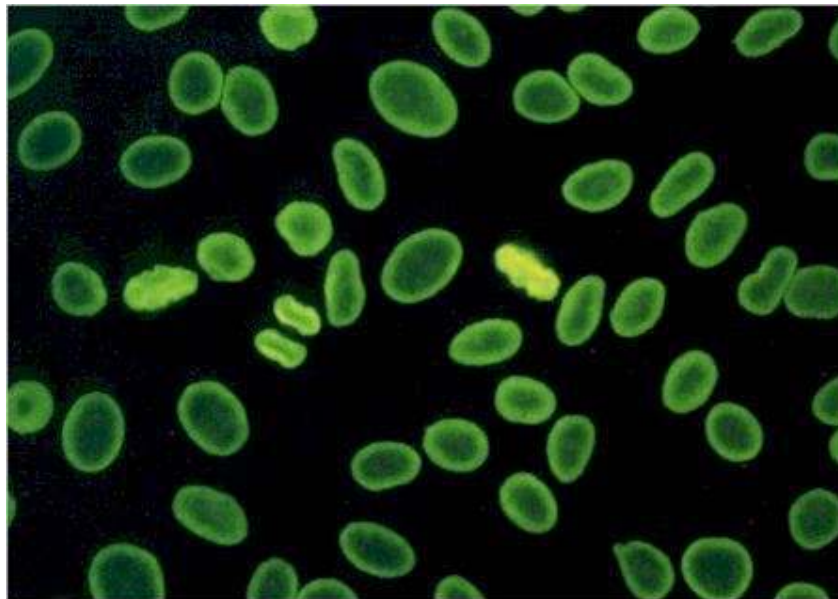


Figura 8 – Aspecto Periférico das células Hep-2 ([www.labodia.com/en7ana/Atlas/anaatlasnuclear.htm](http://www.labodia.com/en7ana/Atlas/anaatlasnuclear.htm))

A pesquisa destes anticorpos e de outros autoanticorpos pode ser feita por outros métodos, tendo sido neste estudo utilizado para além da IFI o método *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) e o Immunoblotting.

### 3.2.4 ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*)

É um método imunoenzimático (EIA) que permite identificar a especificidade do autoanticorpo e quantifica-lo, tendo sido neste trabalho utilizado para a detecção semi-quantitativa de autoanticorpos ds-DNA no soro humano.

Utilizou-se o kit da QUANTA Lite™ dsDNA, em que os poços da microplaca são revestidos com dsDNA do timo de novilho altamente purificado. Os controlos pré-diluídos e as amostras diluídas são adicionados aos diferentes poços, permitindo que quaisquer anticorpos anti-dsDNA presentes se liguem ao antígeno imobilizado. A amostra não ligada é lavada e adiciona-se um conjugado IgG anti-humano marcado a cada poço. Uma segunda incubação permite à enzima marcada ligar-se a quaisquer anticorpos de doentes que tenham ficado ligados aos micropoços. Depois da segunda lavagem para retirar o excesso de conjugado, a restante actividade das enzimas é medida adicionando um substrato cromogénico e medindo a intensidade da cor que se desenvolve. O ensaio é avaliado por espectrofotometria, medindo e comparando a intensidade da cor desenvolvida nos poços referentes às amostras com a cor dos poços dos controlos (Figura 9).

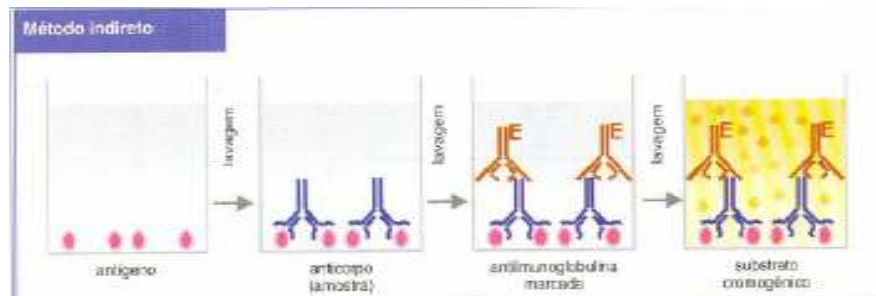


Figura 9 - Método de ELISA - *Enzyme-linked immunosorbent assay* (Técnicas Imunológicas)

### 3.2.5 Immunoblotting

Técnica introduzida em 1982 por Paul Herbinck, em que os antígenos presentes num extrato nuclear são sujeitos a um electroforese em gel de poliacrilamida, na presença de agentes redutores e desnaturantes. Os polipeptídeos são separados em função do peso

molecular e são transferidos para uma membrana de nitrocelulose. As bandas verticais obtidas são incubadas com o soro a testar, e os anticorpos fixados as proteínas são postos em evidência por uma reacção imunoenzimática.

O teste utilizado foi da Euroimmun para a pesquisa de anticorpos contra antígenos nucleares que a seguir são citados:

- RNP/Sm → altos títulos destes autoanticorpos são característicos da doença mista do conectivo e Síndrome de Sharp. A prevalência é 95-100%, e o título destes anticorpos apresentam uma correlação com a actividade da doença. Estes anticorpos são encontrados em 30-40% dos pacientes com LES (Combe, 1989).

- Sm → o anticorpo anti-Sm (a designação Sm, tal como foi dito anteriormente, deve-se ao nome do primeiro paciente, em que este anticorpo foi reconhecido, ser Smith), possui alta especificidade para o LES, embora a sua sensibilidade nestes pacientes seja apenas de 25 a 30%, geralmente durante a fase aguda da doença. Raramente aparece em outras desordens. Alguns estudos associam a sua presença com o envolvimento do sistema nervoso central (SNC), quando manifestação única do LES.

-SSA/Ro-52 → o SSA é uma pequena ribonucleoproteína composta de moléculas de RNA e possui o peso de 60kDa. A banda SSA consiste apenas no antígeno nativo SSA. O Ro-52 é uma proteína de 52 kDa que está associada ao complexo SSA/Ro. Reacções isoladas do anticorpo Ro52 não devem ser consideradas como um SSA positivo uma vez que elas podem aparecer em diferentes doenças autoimunes, embora seja um tema controverso e objecto de alguns estudos. Este complexo aparece com maior frequência nos pacientes com Síndrome de Sjögren (40-80% dos casos), no LES (30-40%), na cirrose biliar primitiva (20%) e ocasionalmente na hepatite crónica activa. Estes anticorpos estão associados a deficiências homozigóticas da fracção C2 e C4 do complemento e ainda ao lúpus eritematoso neonatal.

- SSB/La → o antígeno SSB/La é um polipeptídeo fosforilado que se liga a um número importante de pequenos transcriptos de RNA polimerase III. Os anticorpos produzidos são contra partículas protéicas do RNA que parecem participar como um co-factor para a RNA polimerase. O anti-SSB/La geralmente acompanha o anti-Ro. A presença de ambos no LES é geralmente associada a uma doença mais leve do que quando o Ro está

presente isoladamente. O SSB/La ocorre em mais da metade dos pacientes com síndrome de Sjögren e no LES em 15%.

- Scl-70 → muitas vezes nomeados topoisomerase I. O antígeno Scl-70 é uma proteína cromossómica básica não-histona com um peso molecular de 70kD. Os anticorpos Scl-70 são fortemente específicos de uma esclerodermia e são detectados em 25-75% dos pacientes com essa doença. Esses anticorpos são igualmente encontrados em pacientes que desenvolveram o Síndrome de Crest (variante da esclerodermia) e naqueles que apresentam uma Síndrome de Raynaud primário.

- PM-Scl → estes anticorpos foram descritos inicialmente por Wolfe e colaboradores em 1977 em pacientes com polimiosite e designados por anticorpos anti-PM. Mais tarde estudos de Reichlin e colaboradores em 1984 levaram a uma caracterização mais específica de anticorpos PM-1 (PM-Scl). Foram detectados em 50-70% de pacientes com “Síndrome Overlap” com combinação de sintomas de polimiosite, dermatomiosite e esclerose sistémica progressiva.

- Jo-1 → igualmente denominado histidina-t-RNA-sintetase, o antígeno Jo-1 é um polipéptido de peso molecular de 50kD, correspondendo a parte proteica da histidina-t-RNA-sintetase, que está envolvido na transdução. Estes anticorpos estão presentes em mais de 30% dos pacientes com polimiosite, é mais raro em pacientes com dermatomiosite (aproximadamente 10%) e em outras doenças reumáticas. Existem evidências que os títulos de anti-Jo-1 podem variar em concordância com a actividade da miosite e tem sido sugerido, que a quantificação pode ser útil na avaliação clínica destes pacientes.

- Centrómero → estão associados com a esclerose sistémica progressiva (síndrome de Crest: doença de Raynaud e disfunção esofágica) e estão presentes em 70-90% destes pacientes.

- PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) → proteína de 34kD com alta especificidade para os pacientes com lúpus eritematoso sistémico, a prevalência é de cerca de 3% devido a sua baixa sensibilidade.

- Histonas → estão presentes em 96% dos pacientes com lúpus induzido por drogas, em 30-70% do LES e 15-50% nos pacientes com artrite reumatóide.
- dsDNA → são específicos do LES. Para além destes, os anticorpos contra Sm são os marcadores serológicos desta doença com uma prevalência de 40-90%.
- Nucleossomas → são detectados no soro de pacientes com LES. Porém, não aparecem no soro de pacientes com esclerodermia, Síndrome de Sjögren e polimiosite. O teste contra os nucleossomas apresenta uma alta especificidade para o LES, próximo dos 100%.
- Proteína P ribossomal → são específicos do LES embora o título destes anticorpos não tenha uma boa correlação com a actividade da doença. Estes anticorpos são mais frequentes em doentes com psicoses embora a diferença não seja estatisticamente significativa.
- AMA-M2 → altos títulos destes anticorpos são característicos da cirrose biliar primitiva. Anticorpos contra M2 também já foram detectados, embora em títulos mais baixos em doenças crónicas do fígado (30%) e na esclerose sistémica progressiva (7-25%).

### 3.2.6 Nefelometria

O Nefelómetro utilizado neste trabalho é o IMAGE da Beckman Instruments. A nefelometria é um método que obedece ao princípio da dispersão da luz, que é um fenómeno que resulta da interacção da luz com uma partícula em suspensão. Quando um foco de luz incide numa partícula em suspensão, esta sofre uma série de fenómenos, de tal modo que parte da luz é dispersa, parte é reflectida, outra porção é absorvida e parte da luz é transmitida.

A luz ao atravessar um meio, no qual existe uma suspensão de partículas sólidas, dispersa em todas as direcções e como consequência é observada turvação. A dispersão de luz altera apenas a direcção de propagação pois a intensidade é a mesma em qualquer ângulo.

A técnica imunonefelométrica mede o aumento da intensidade de luz dispersa em ângulos distintos aos de incidência (entre 15 e 90°) devido à existência de complexos antígeno-anticorpo. O nefelómetro utilizado tem como fonte de luz incidente um laser de 670nm e em que o detector está colocado a um ângulo de 90° face ao detector para medir a luz dispersa.

As dosagens nefelométricas são determinadas fazendo passar um feixe de luz através de um “mistura” em que a luz é dispersa a um determinado ângulo, normalmente 90° a partir do feixe incidente.

A formação de complexos antígeno-anticorpo formados são insolúveis, dando um aspecto turvo às soluções, dispersando a luz incidente e gerando um sinal eléctrico. A relação entre a quantidade de antígeno (proteína) e o sinal medido, com a concentração constante de anticorpo, é directamente proporcional.

Um computador anexado ao nefelómetro tem a capacidade de converter o sinal obtido no detector da luz dispersa em unidades relativas de dispersão. Esta medida é utilizada para calcular a quantidade de antígeno presente nas amostras a testar.

Por nefelometria foram doseadas as fracções C3 e C4 do complemento e a Proteína C Reactiva (PCR).

### 3.2.7 Avaliação da actividade da doença

A actividade foi avaliada com base no índice de SLEDAI em 3 grupos: alta actividade (mais que 11 pontos), actividade moderada (2-10 pontos) e sem actividade (0 e 1 ponto) conforme definições do anexo 2 (Bombardier et al, 1992).

### 3.2.8 Estatística

O tratamento estatístico foi realizado no programa SPSS (Statistical Package for Social Sciences) do Windows versão 15,0. Os testes utilizados foram Mann-Whitney e Kruskal-Wallis (testes não paramétricos) e o T-student e Fisher's (testes paramétricos).

O teste Mann-Whitney foi utilizado para fazer a comparação dos resultados entre os dois grupos, controlos e pacientes, enquanto o teste Kruskal-Wallis foi utilizado para fazer comparações entre parâmetros do mesmo grupo. São ambos testes não paramétricos utilizados quando se rejeita a hipótese das amostras seguirem uma distribuição normal.

O teste T-student foi utilizado para fazer a comparação entre os dois grupos, controlos e pacientes. Trata-se de um teste paramétrico em que não foi rejeitada a hipótese das

amostras seguirem uma distribuição normal. O teste de Fisher's, é um teste utilizado para comparar parâmetros agrupados em 2x2, tendo sido utilizado para verificar a relação da actividade da doença com a terapêutica administrada.



## 4 RESULTADOS

### 4.1 Frequência dos sintomas nos pacientes com LES

No presente estudo a avaliação da actividade da doença fundamentou-se em parâmetros clínicos e laboratoriais, adaptando um dos critérios anteriormente sugeridos (Mosca et al, 2006; Bombardier et al, 1992).

Os parâmetros clínicos foram baseados na presença de sinais e de sintomas nos pacientes: exantema malar ou em borboleta (verpértílio), fotossensibilidade, alterações cutâneas (tais como a alopecia), úlceras orais, artrite, serosite, alterações ao nível renal e neurológico, (anexo 3), e em alguns parâmetros laboratoriais nomeadamente as fracções C3 e C4 do complemento, proteína C reactiva (PCR) e ainda pesquisa dos anticorpos anti-nucleares e anti-ácido desoxirribonucleico de cadeia dupla (anti-dsDNA) e pela presença de anticorpos contra antígenos nucleares (ENAs) (anexo 4). As frequências desses sintomas são apresentadas na Figura 10 em que se observa uma maior incidência das alterações cutâneas e artrite neste grupo de pacientes com LES.

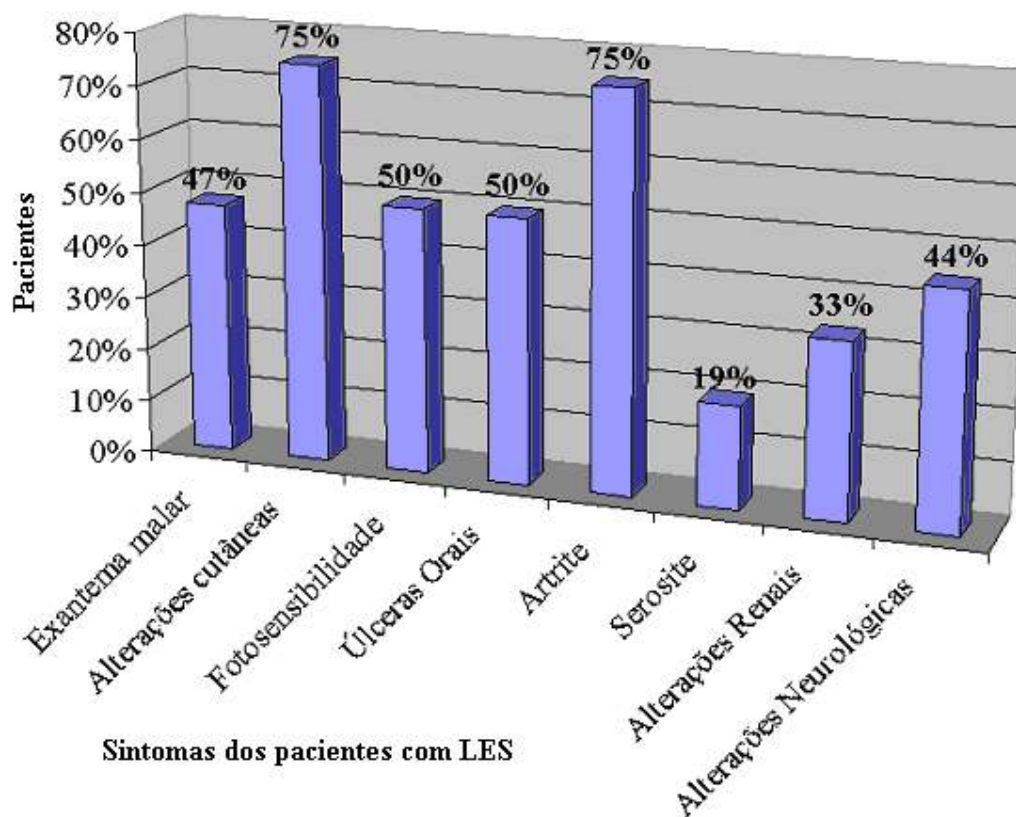


Figura 10 - Frequências dos sintomas no grupo de pacientes com LES

#### **4.2 Avaliação da actividade da doença e sua relação com os principais sintomas clínicos**

Considerou-se para o cálculo do índice de actividade SLEDAI os dados obtidos através dos questionários preenchidos pelos participantes no caso dos pacientes da Associação de Doentes com Lúpus e pelos dados fornecidos pelo Dr Luís Dustchmman no caso dos pacientes da consulta de medicina II do Hospital Fernando Fonseca. Foram considerados na avaliação da actividade apenas os sintomas que os pacientes apresentavam até 10 dias antes da colheita das amostras biológicas. Para além desses dados foram de extrema importância os parâmetros laboratoriais que permitem, sem qualquer dúvida, a atribuição de pontos para os casos em que foram detectados anticorpos anti – dsDNA e diminuição das concentrações dos factores C3 e C4 do complemento. Segundo o índice de SLEDAI e devido à dimensão da amostra de pacientes subdividiram-se estes apenas em 3 grupos de actividade: alta actividade (mais do que 11 pontos), actividade moderada (2-10 pontos) e sem actividade (0 e 1 pontos). Obteve-se um total de 36 pacientes cujos os resultados são seguidamente apresentados no Quadro 2.

**Caracterização das Populações Linfocitárias em pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico, e sua relação com a actividade da doença**

Quadro 2 - Atribuição da Actividade da Doença adaptando o índice SLEDAI

Pacientes com LES	Actividade da Doença	Pontos	Sintomas considerados na atribuição de pontos
1	2	11	Alterações cutâneas, artrite, leucopenia, dsDNA+, hipocomplementemia
2	1	8	Alterações cutâneas, proteinúria e hipocomplementemia
3	2	11	Proteinúria, úlceras orais, leucopenia, dsDNA+ e hipocomplementemia
4	0	0	—
5	2	13	Alterações cutâneas, artrite, úlceras orais, leucopenia, dsDNA+ e hipocomplementemia
6	0	0	—
7	1	6	Pericardite, alterações cutâneas e hipocomplementemia
8	1	4	Úlceras orais e dsDNA+
9	0	0	—
10	1	8	Artrite, dsDNA+ e hipocomplementemia
11	1	10	Artrite, úceras orais, dsDNA+ e hipocomplementemia
12	0	0	—
13	2	11	Alterações cutâneas, artrite, síndrome febril, leucopenia, trombocitopenia e hipocomplementemia
14	1	3	Alterações cutâneas e leucopenia.
15*	0	0	Hipocomplementemia
17	1	7	Artrite, leucopenia e hipocomplementemia
18	2	11	Alterações cutâneas, artrite, dsDNA+, leucopenia e hipocomplementemia
19	1	10	Alterações cutâneas, artrite, dsDNA+ e hipocomplementemia
20	1	5	Úlceras orais, leucopenia e hipocomplementemia
21	0	0	—
22	1	8	Artrite, dsDNA+ e hipocomplementemia
23	1	5	Alterações cutâneas, dsDNA+ e leucopenia.
24	1	4	Alterações cutâneas e hipocomplementemia
25*	0	1	Leucopenia
26	2	13	Artrite, proteinúria, leucopenia, dsDNA+ e hipocomplementemia
27*	0	1	Leucopenia
28	1	7	Proteinúria, dsDNA+ e leucopenia
29	1	6	Proteinúria e dsDNA+.
70	1	3	Alterações cutâneas e leucopenia.
71	2	11	Alterações cutâneas, artrite, leucopenia, dsDNA e hipocomplementemia
72	1	3	Leucopenia e hipocomplementemia
73	2	11	Úlceras orais, artrite, leucopenia, dsDNA+ e hipocomplementemia
74	1	7	Úlceras orais, leucopenia, dsDNA e hipocomplementemia
75	1	5	Leucopenia, dsDNA+ e hipocomplementemia
76	2	13	Alterações neurológicas, leucopenia, dsDNA+ e hipocomplementemia
77	1	7	Alterações cutâneas, síndrome febril, dsDNA+ e hipocomplementemia

**Caracterização das Populações Linfocitárias em pacientes com Lúpus Eritematoso Sistémico, e sua relação com a actividade da doença**

O paciente número 15 apresentou o doseamento da fracção C4 ligeiramente diminuído e os doentes números 25 e 27 apresentaram leucopenia, no entanto não lhes foi atribuída actividade da doença visto se encontrarem clinicamente bem e apenas com estas manifestações possíveis de atribuição de pontos no índice SLEDAI.

Nos Quadros 3, 4 e 5 são apresentados os sintomas clínicos mais comuns para os pacientes analisados.

Quadro 3 - Relação dos sintomas mais frequentes com a actividade da doença

Sintomas	Alterações Cutâneas n=26			Artrite n=26		
Actividade da Doença	2	1	0	2	1	0
Número de pacientes	7	12	8	8	14	5
Percentagem em relação ao total pacientes	19%	33%	22%	22%	39%	14%
% em relação aos que apresentam estes sintomas	26%	44%	30%	30%	52%	19%

Quadro 4 - Relação dos sintomas menos frequentes com a actividade da doença

Sintomas	Serosite n=6			Alterações Renais n= 10		
Actividade da Doença	2	1	0	2	1	0
Número de pacientes	1	5	1	2	4	2
Percentagem em relação ao total pacientes	3%	14%	3%	6%	11%	6%
% em relação aos que apresentam estes sintomas	14%	71%	14%	25%	50%	25%

Quadro 5 - Relação das alterações cutâneas e artrite com a actividade da doença

Sintomas	Alterações Cutâneas e Artrite		
Actividade da Doença	2	1	0
Número de pacientes	6	0	0
Percentagem em relação ao total pacientes	17%	0%	0%
% em relação aos que apresentam estes sintomas	100%	0%	0%

A percentagem em relação ao total dos pacientes do estudo relaciona a quantidade de pacientes que apresentam o respectivo sintoma em relação à totalidade da amostra, 36 indivíduos. A percentagem em relação aos pacientes que apresentam um determinado sintoma, refere-se à distribuição destes sintomas face à actividade da doença.

Como se pode verificar nos quadros acima apresentados as alterações cutâneas e a artrite foram as manifestações mais frequentes, enquanto que a serosite e as alterações renais foram as menos frequentes nesta amostra. Na análise dos sintomas quando avaliados isoladamente não foi observada qualquer relação com a actividade da doença, no entanto na análise em simultâneo das alterações cutâneas com artrite verificou-se que

os pacientes que apresentavam ambas as manifestações estavam relacionados com uma maior actividade da doença.

#### 4.3 Frequência dos autoanticorpos no grupo de pacientes com LES

Ainda em relação aos parâmetros laboratoriais fez se a pesquisa do anticorpo anti-dsDNA em todos os pacientes e verificou-se que vinte dos trinta e seis pacientes com LES eram positivos embora nem todos tivessem títulos positivos para os ANAs.

Nos 17 pacientes que apresentaram títulos positivos para os ANAs, independentemente do resultado da pesquisa do dsDNA, foi feita a pesquisa de ENAs e nesse grupo encontrou-se com uma maior frequência o anticorpo anti-Ro-52 estando na maioria dos casos associado a sua presença os anticorpos anti-SSA e anti-SSB (Figura 11). Confirmou-se em três pacientes aleatoriamente escolhidos (números 9, 21 e 72) que possuíam ANA e dsDNA negativos e também tiveram um resultado negativo na pesquisa de ENAs (Anexo 4).

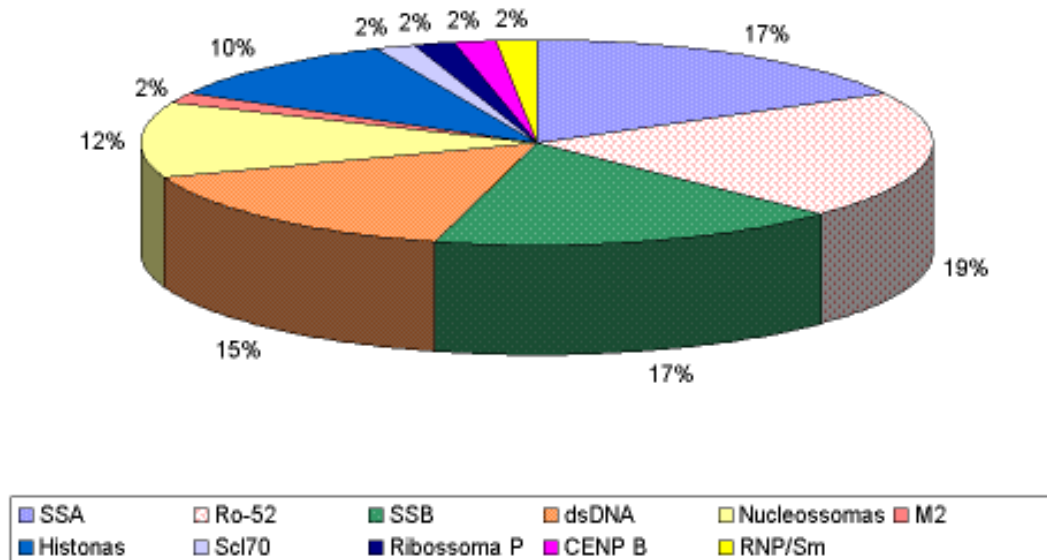


Figura 11 - Frequências das ENAs nos pacientes com títulos positivos de anticorpos anti-nucleares.

#### 4.4 Determinação dos factores C3 e C4 do complemento nos dois grupos e sua relação com a presença do anticorpo anti-dsDNA no grupo de pacientes com LES.

A pesquisa dos ANA e dos anti- dsDNA para além do grupo de pacientes, foi feita em todos os indivíduos do grupo controlo, com a finalidade de confirmar que se tratavam de indivíduos saudáveis, e que, por conseguinte não apresentaram serologicamente nenhuma doença autoimune (Anexo 5). A proteína C reactiva (PCR) foi determinada para verificar se algum dos pacientes analisados teria uma inflamação de fase aguda capaz de influenciar outros dados imunológicos, nomeadamente o número de linfócitos. Para além destes parâmetros foram determinados os factores C3 e C4 do complemento nos dois grupos, pacientes e controlo (Anexos 4 e 5). Para comparar as concentrações dos factores C3 e C4 do complemento entre os dois grupos, usou-se o teste paramétrico T-student. Os resultados apresentados nas Figuras 12 e 13 mostram que as concentrações de ambos os factores eram significativamente menores no grupo de pacientes do que no grupo controlo.

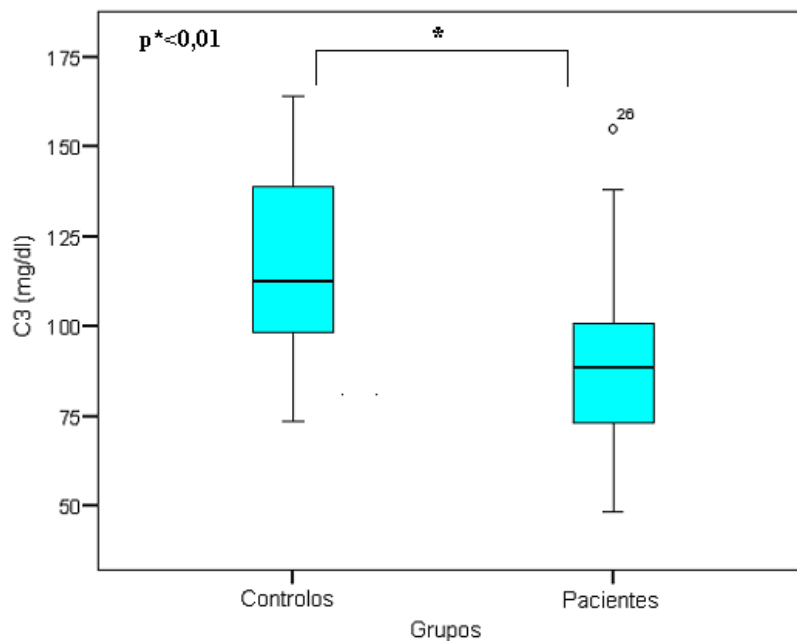


Figura 12 - Concentração do factor C3 do complemento nos dois grupos.

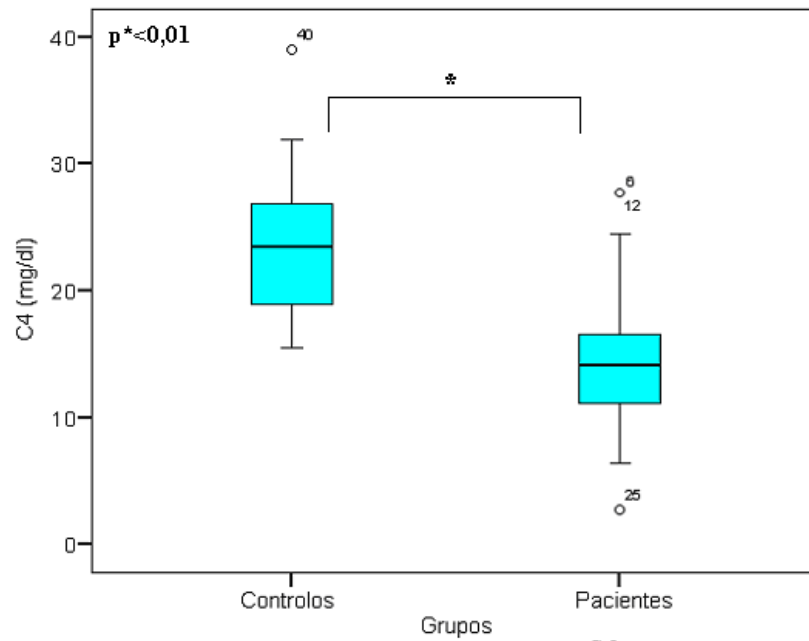


Figura 13 - Concentração do factor C4 do complemento nos dois grupos.

Posteriormente verificou-se a relação entre os factores C3 e C4 do complemento em ambos os grupos e verificou-se que existe uma correlação mais forte entre o C3 e C4 no grupo dos pacientes ( $p=0.732$ ) do que no grupo dos controlos ( $p=0.483$ ) embora seja evidente a existência de associação entre ambos os parâmetros (Figura 14).

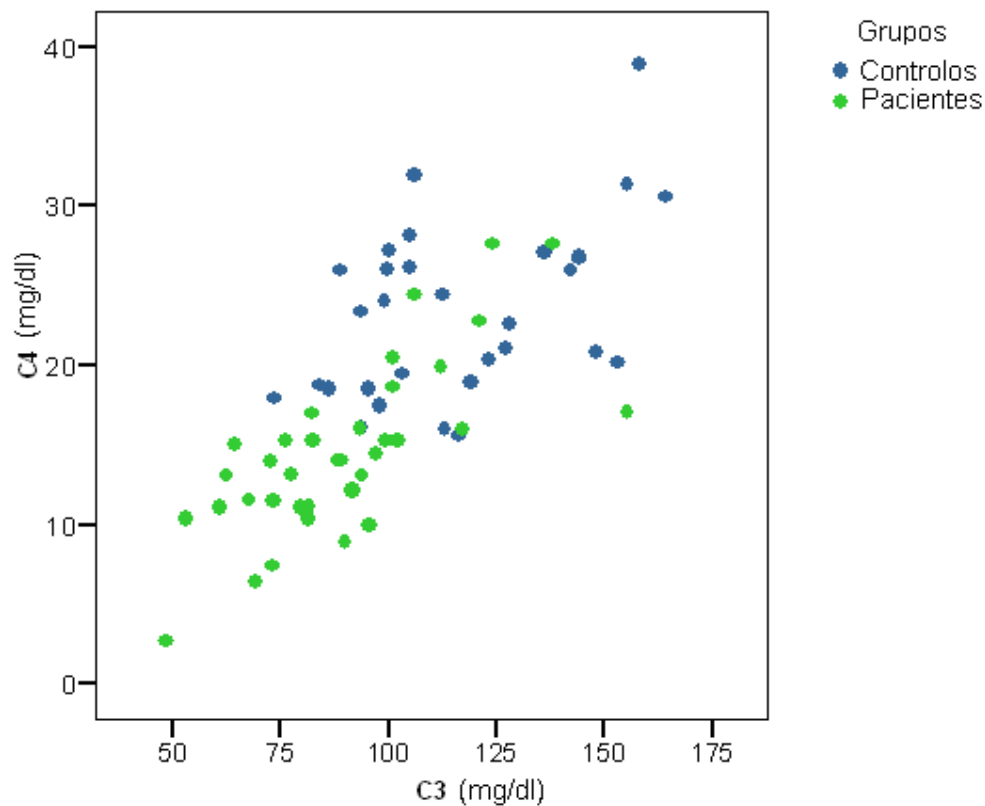


Figura 14 - Relação entre os factores C3 e C4 do complemento nos dois grupos.

Ao relacionar a presença do anticorpo anti-dsDNA com o factor C4 do complemento, (Figura 15), observou-se que deve ser rejeitada a hipótese de haver relação entre a presença de anti-dsDNA e uma diminuição do factor C4 do complemento. Devido ao valor encontrado ( $p= 0.055$ ) não será correcto afirmar que não exista a relação inversa entre ambos os parâmetros.



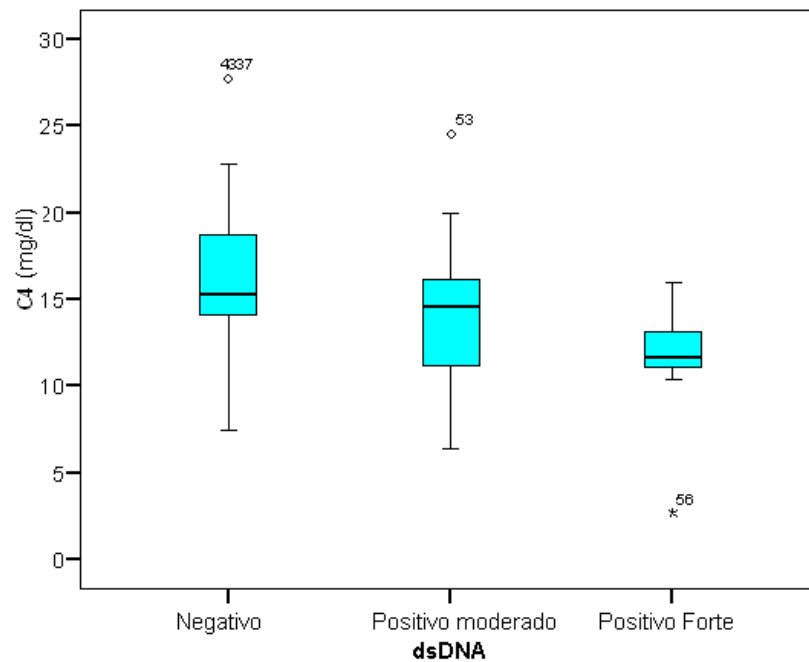


Figura 15 - Relação do factor C4 do complemento com o dsDNA.

#### 4.5 Relação dos valores absolutos e percentuais das populações linfocitárias no grupo de pacientes com LES com o grupo controlo.

Os valores absolutos e percentagens das populações linfocitárias para o grupo de pacientes com LES e para o grupo controlo estão representados respectivamente nos Anexos 6 e 7.

Ao compararmos os valores dos linfócitos totais nesses dois grupos verificou-se uma diferença significativa (  $p < 0,01$ , teste de Mann-Whitney) tal como se pode verificar na Figura 16.

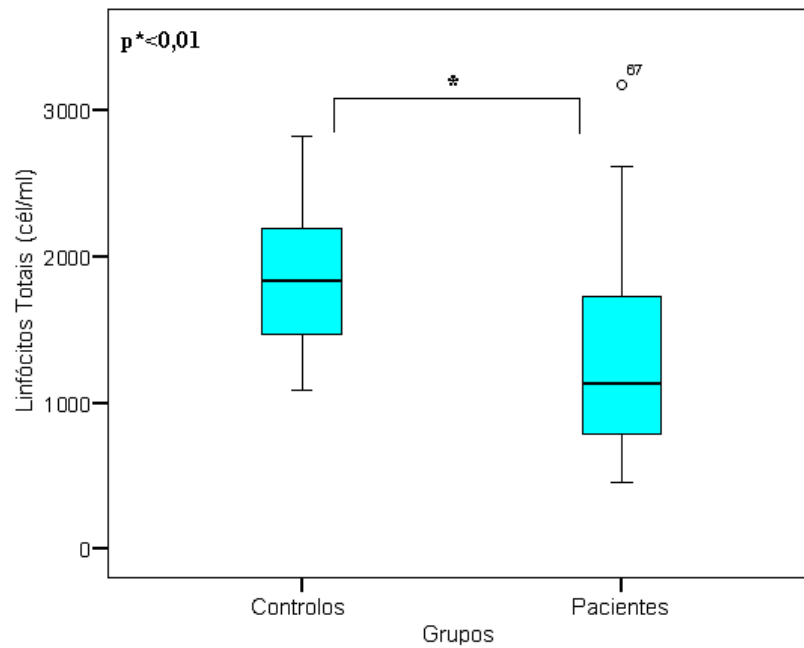


Figura 16 - Valores de Linfócitos totais nos dois grupos.

Visto que os valores de linfócitos totais nos pacientes com LES são significativamente inferiores aos do grupo controlo, será de esperar que as diferentes populações linfocitárias também apresentem valores absolutos significativamente diferentes em relação ao grupo controlo tal como está apresentado nas Figuras 17, 18 19, 20 e 21.

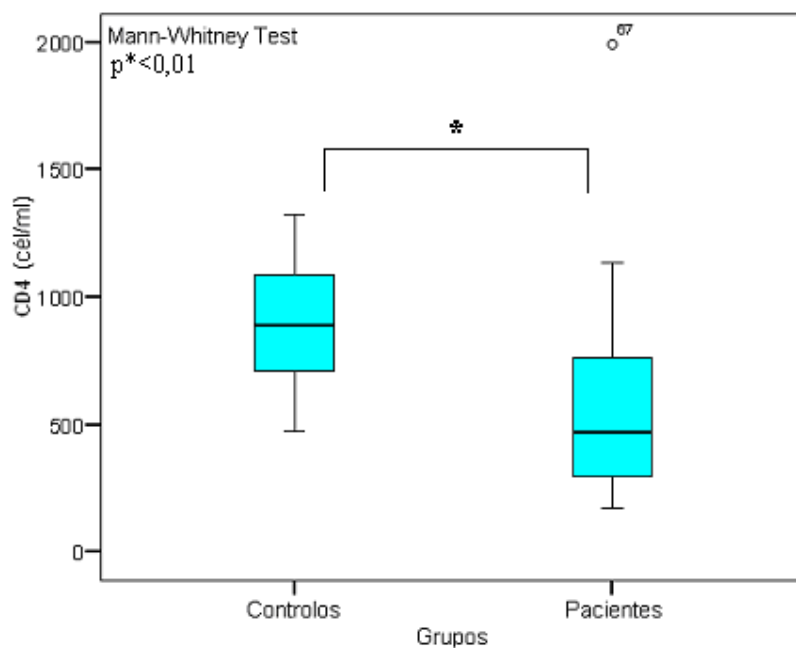


Figura 17 - Análise dos valores absolutos dos CD4 nos dois grupos

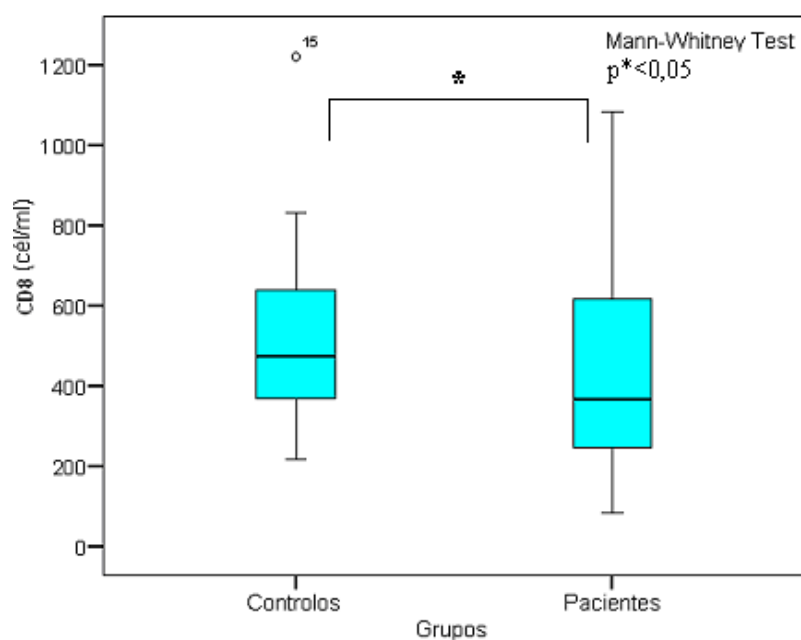


Figura 18 - Análise dos valores absolutos dos CD8 nos dois grupos

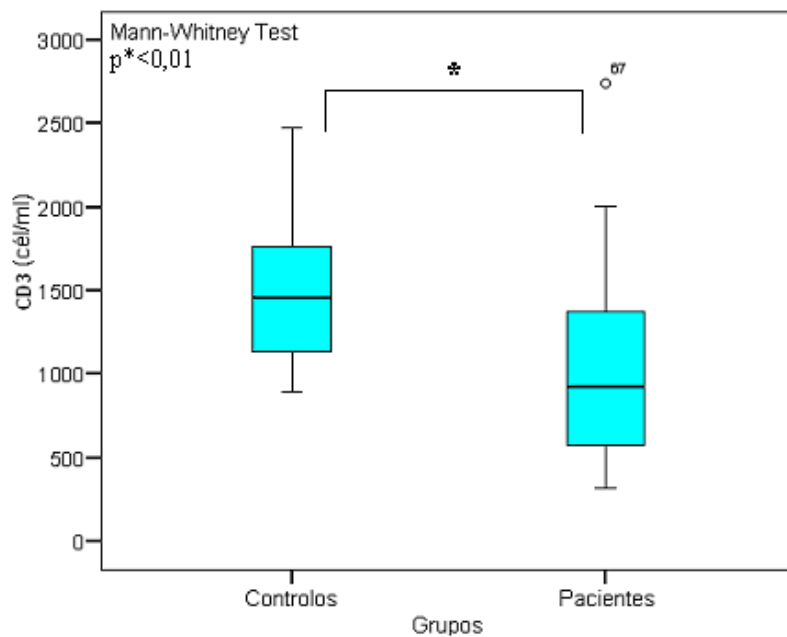


Figura 19 - Análise dos valores absolutos dos CD3 nos dois grupos

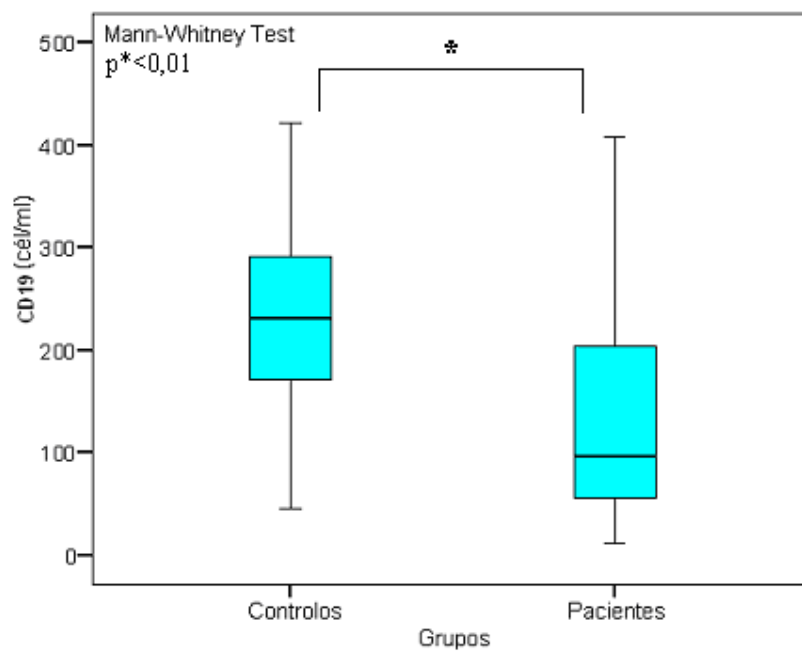


Figura 20 - Análise dos valores absolutos dos CD19 nos dois grupos

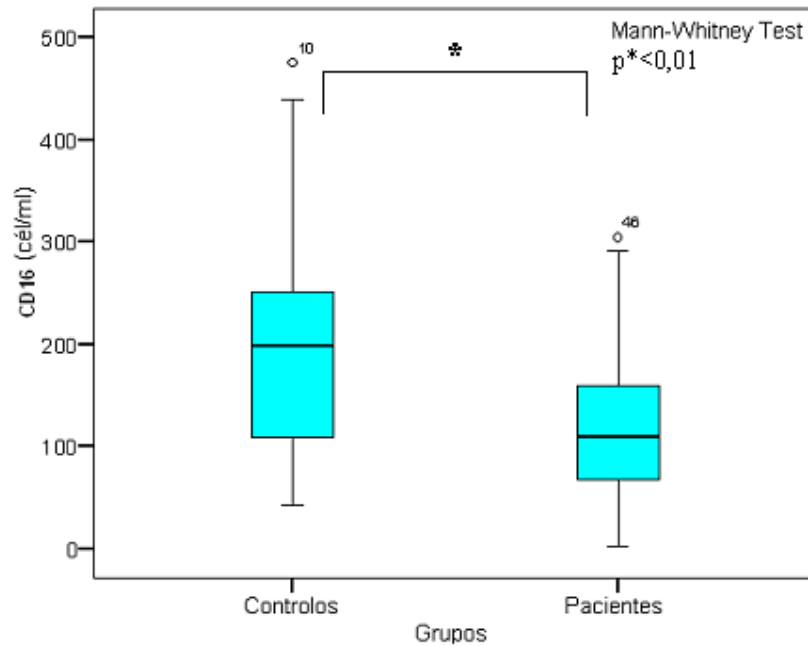


Figura 21 - Análise dos valores absolutos dos CD16 nos dois grupos

Na análise das percentagens das diferentes populações linfocitárias do grupo de pacientes com LES em relação ao grupo controlo, os resultados mostraram ser significativos em relação as populações dos CD4 e CD19 apresentados respectivamente nas Figuras 22 e 23.

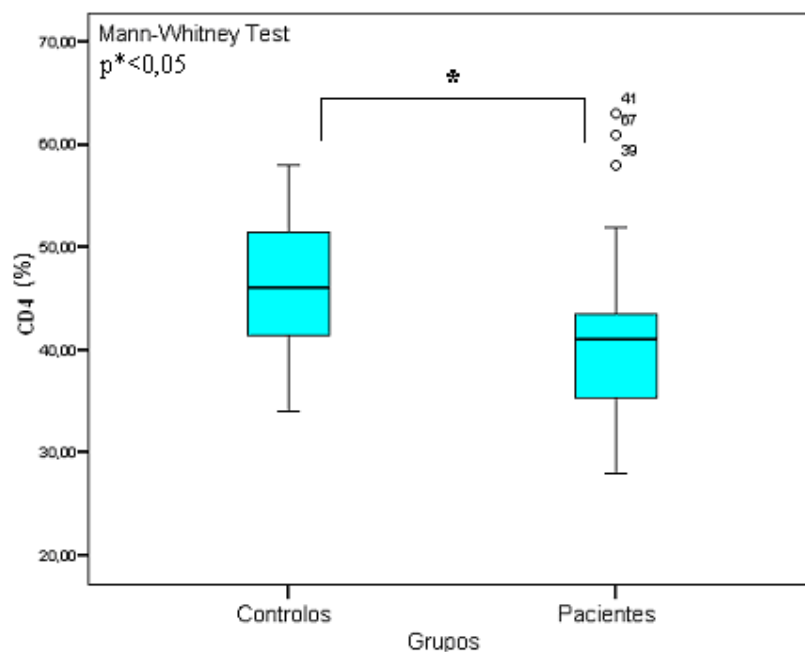


Figura 22 - Percentagem dos CD4 nos dois grupos

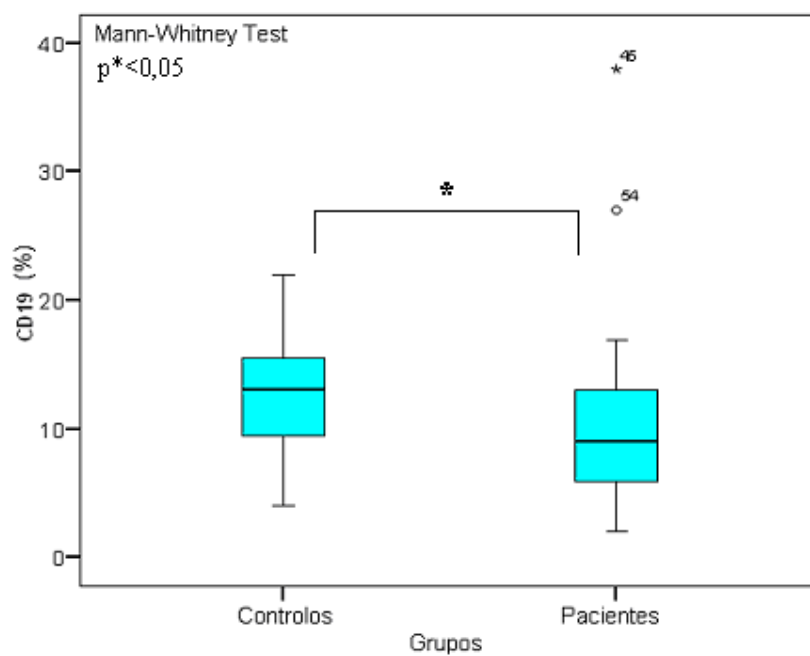


Figura 23 - Percentagem dos CD19 nos dois grupos

A percentagem das células CD4 e CD19 foram inferiores no grupo dos pacientes em relação ao grupo dos controlos, tal como foi observado nos valores absolutos destas populações linfocitárias. A diferença não foi significativa ( $p > 0.05$ ) na relação das percentagens dos CD8, CD3 e CD16 entre os dois grupos.

A razão CD4/ CD8, apresentou-se significativamente menor nos pacientes relativamente aos controlos tal como se pode verificar no gráfico da Figura 24. Tal facto será devido ao menor decréscimo das células CD8 em relação aos CD4 no grupo dos pacientes.

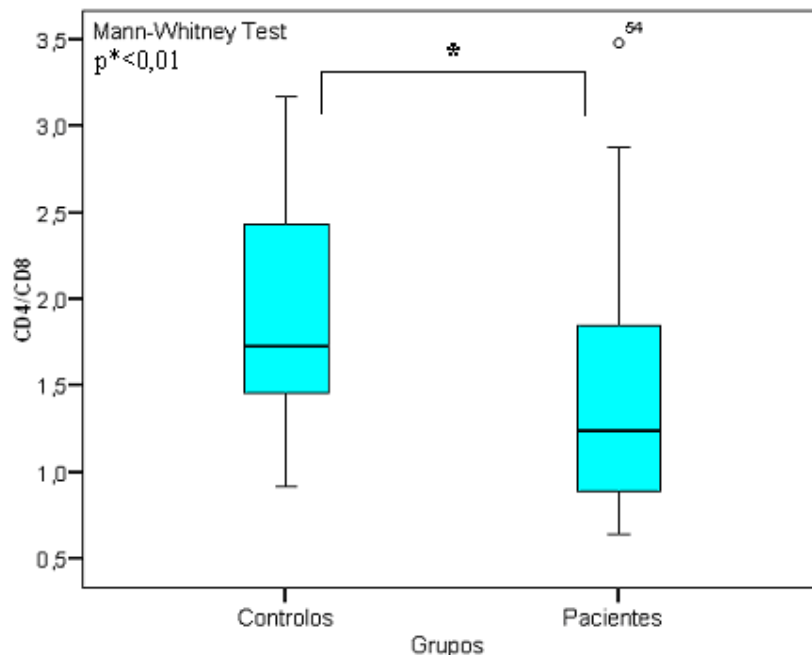


Figura 24 - Comparação da razão CD4/CD8 nos dois grupos

#### 4.6 Relação dos valores absolutos e percentuais das populações linfocitárias segundo a actividade da doença, no grupo de pacientes com LES

As análises das populações linfocitárias em função da actividade da doença estão representadas nas Figuras 25, 26, 27, 28 e 29. Verificou-se, tanto nas contagens absolutas para os linfócitos totais como para as suas subpopulações uma diferença significativa ( $p < 0.01$ , teste de Kruskal-Wallis), que quanto maior a actividade da doença menor o número de linfócitos.

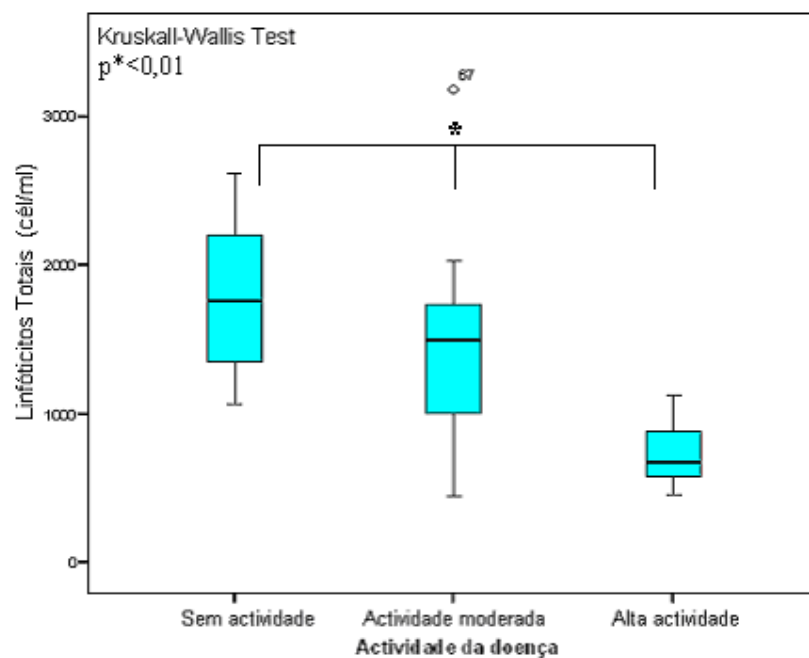


Figura 25 - Análise dos valores absolutos dos Linfócitos totais em função da actividade da doença



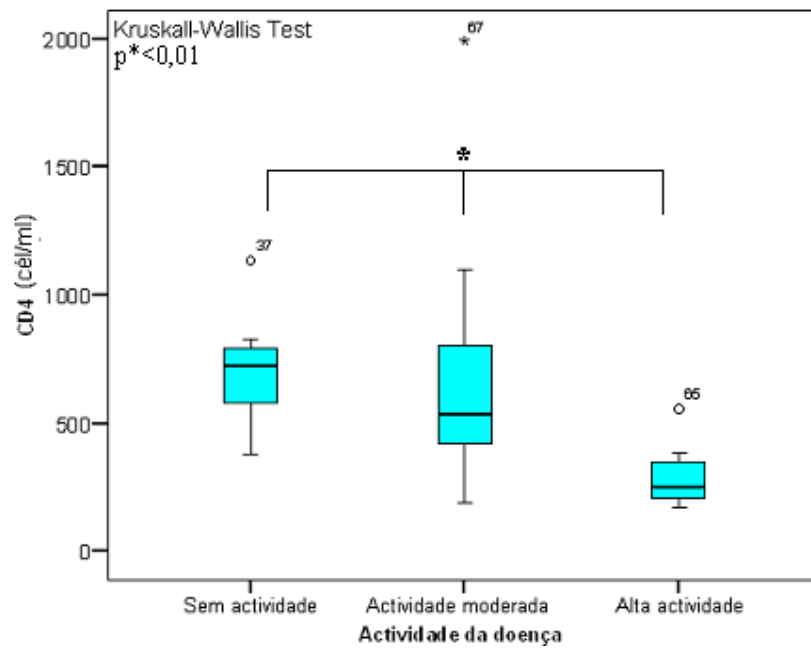


Figura 26 - Análise dos valores absolutos dos CD4 em função da actividade da doença

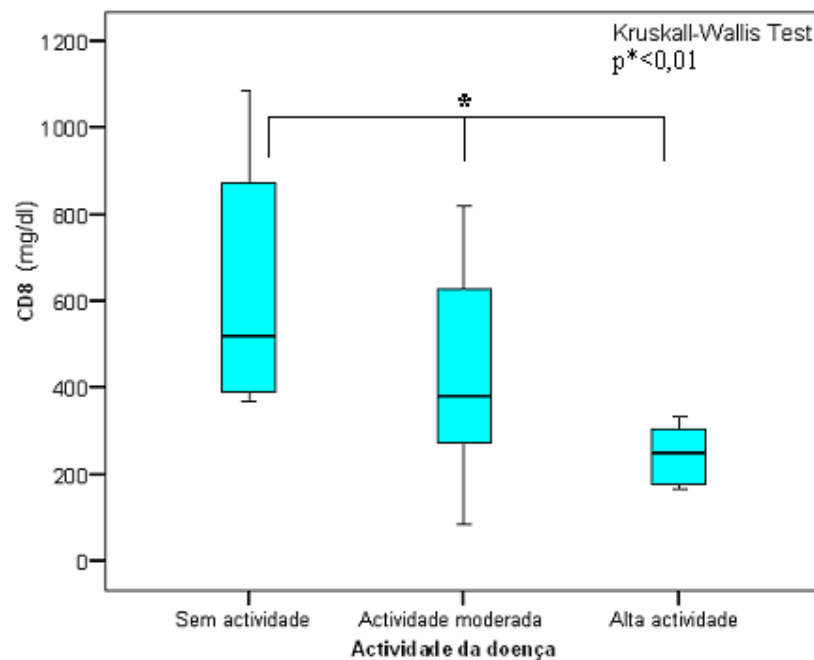


Figura 27 - Análise dos valores absolutos dos CD8 em função da actividade da doença

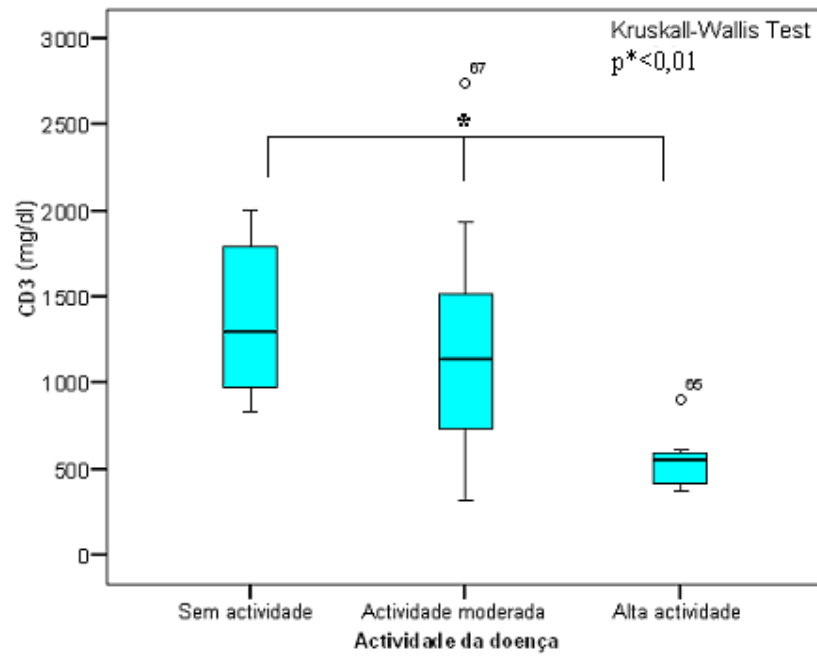


Figura 28 - Análise dos valores absolutos dos CD3 em função da actividade da doença

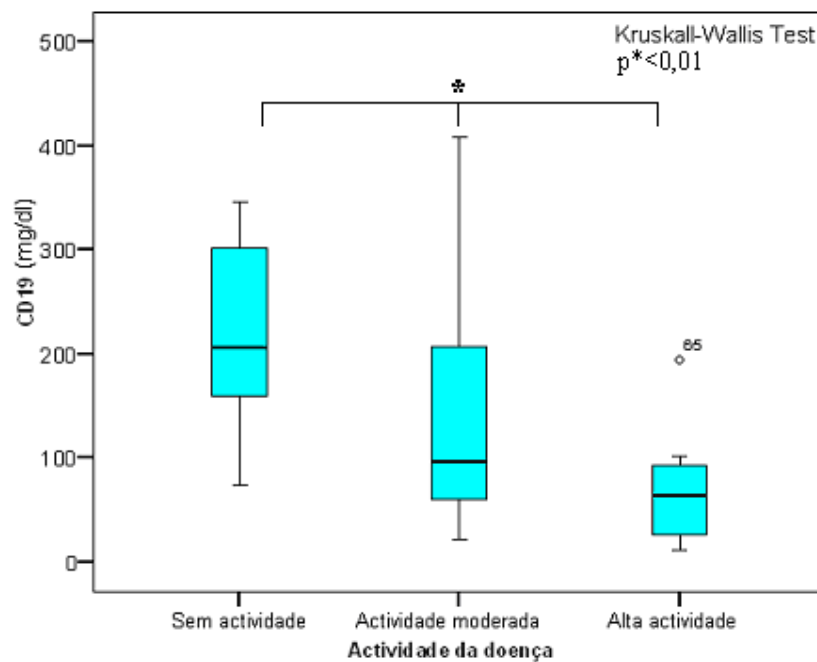


Figura 29 - Análise dos valores absolutos dos CD19 em função da actividade da doença

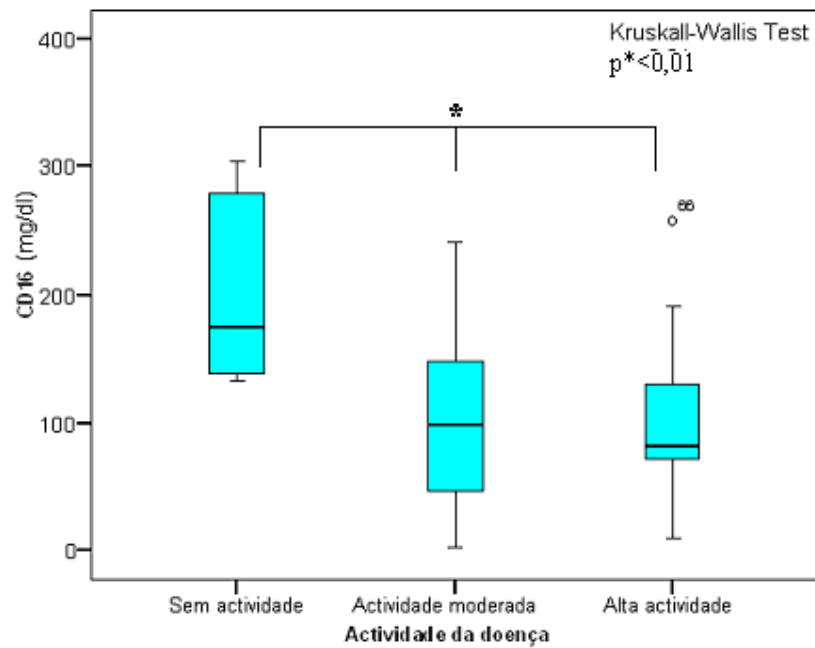


Figura 30 - Análise dos valores absolutos dos CD16 em função da actividade da doença

Na análise das percentagens das subpopulações linfocitárias não foram obtidas diferenças significativas ( $p > 0.05$ ), contudo foi visível a dispersão dos valores de linfócitos nos pacientes classificados com moderada e alta actividade em relação aos pacientes sem actividade da doença. Tal como nos gráficos das percentagens não se obteve diferença significativa na análise da razão CD4/CD8 em relação à actividade da doença.

#### 4.7 Relação dos factores C3 e C4 do complemento com a actividade da doença

Na análise dos factores C3 e C4 do complemento em função da actividade da doença foi observada uma diminuição significativa ( $p < 0.01$ ) em ambos os casos (Figuras 31 e 32), sendo que quanto maior a actividade da doença menor é a concentração de ambos os factores do complemento.

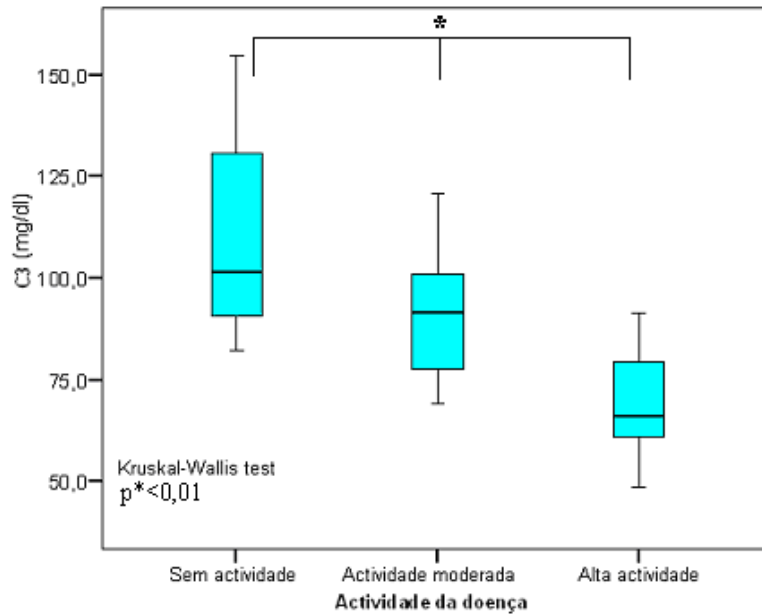


Figura 31 - Concentração do factor C3 em função da actividade da doença

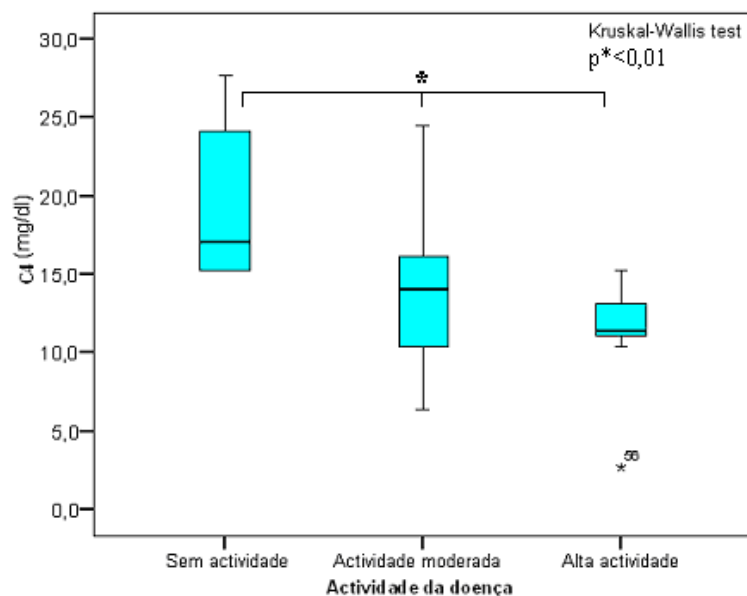


Figura 32 - Concentração do factor C4 em função da actividade da doença

#### 4.8 Relação da classe terapêutica com a actividade da doença

A terapêutica instituída tem grande importância a nível da resposta imunológica. Tratam-se de doentes que tomam medicamentos não só para minimizar os efeitos e a sintomatologia desta doença como para evitar surtos de sintomas clínicos que comprovadamente aumentam na abstenção total de terapêutica.

A fim de avaliar o efeito da terapêutica dividiram-se em 4 classes os pacientes com LES de acordo com a terapêutica administrada (anexo 8). A primeira classe incluiu os pacientes que tomaram apenas um anti-malárico, a segunda apenas um corticoíde, a terceira classe para aqueles que tomaram corticoides e anti-maláricos e a quarta classe para aqueles em que foi administrada também um imunossupressor.

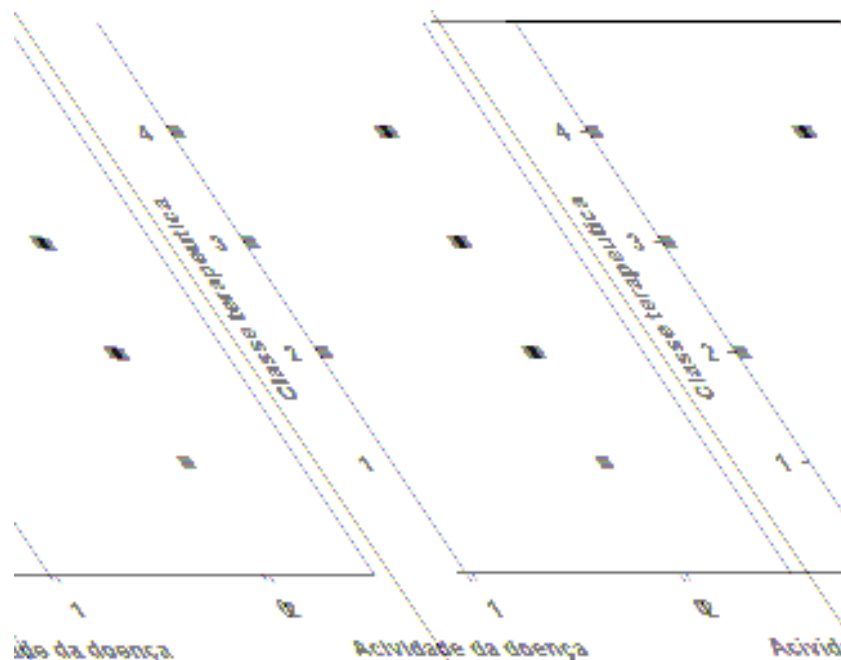


Figura 33 - Relação da classe terapêutica com a actividade da doença.

Tentou relacionar-se a terapêutica administrada com os valores das populações linfocitárias e com a actividade da doença.

Com os valores das populações linfocitárias não houve qualquer relação com as classes terapêuticas consideradas. Relativamente a terapêutica e actividade da doença pode-se considerar que a terapêutica da classe 1 corresponde a um paciente sem actividade da

doença e que os pacientes com actividade da doença moderada e elevada correspondem as outras classes de terapêutica tal como está apresentado na Figura 33.

No tratamento estatístico, utilizando o teste de Fisher's (2x2), associou-se em apenas dois grupos a actividade da doença (sem e com actividade), e em dois grupos as classes terapêuticas (1 e 2). A primeira classe corresponde aos pacientes que apenas tomam anti-malárico e corticoídes e a segunda classe corresponde aos pacientes que para além desses medicamentos ainda tomam imunossuppressores.

Nesta análise foi encontrado um  $p=0,032$ , indicador de uma forte probabilidade, que corresponde a toma de terapêutica da primeira classe para os pacientes sem actividade da doença e a terapêutica da segunda classe para os pacientes com actividade da doença.

## **5 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO**

O lúpus eritematoso sistémico (LES) é, provavelmente, a síndrome ou doença autoimune mais largamente estudada. No entanto, quer a sua etiologia quer os seus mecanismos fisiopatológicos, continuam a ser pouco claros, apesar da evolução verificada e dos enormes progressos observados na compreensão da fisiologia do sistema imunológico. Em geral, quando os doentes apresentam os primeiros sintomas, estes são incipientes e inespecíficos, confundindo-se por isso com outras patologias que inicialmente têm sintomas e sinais semelhantes. Desta forma, torna-se muitas vezes difícil estabelecer o diagnóstico e nem mesmo o recurso aos parâmetros serológicos, especialmente os relacionados com o sistema imunitário, dão um contributo decisivo (Ferreira, 1998).

Houve necessidade, por isso, de recorrer à criação de critérios para a classificação do LES. No entanto, a sua sensibilidade e especificidade não são totais e, assim, os próprios critérios têm que sofrer modificações que periodicamente os actualizem (Mosca et al, 2006).

O diagnóstico é complicado devido à heterogeneidade fenotípica e às diferenças observadas entre doentes e mesmo no próprio doente durante a sua evolução clínica, pelo que se reveste de interesse a pesquisa de novos métodos de caracterização da doença para fins diagnósticos e de monitorização da mesma.

A realização de vários estudos (Bombardier et al, 1992; Strand et al, 1999; Ibañez et al, 2007) conduziu ao aparecimento de diversos índices de actividade da doença. A definição de actividade da doença, até ao momento presente, não está feita de modo satisfatório e não há um verdadeiro consenso quanto ao seu significado.

Neste trabalho a avaliação da actividade da doença foi determinada segundo o índice SLEDAI por ser aquele que se baseia somente na presença ou ausência de determinados parâmetros clínicos e laboratoriais evitando deste modo uma caracterização quanto a gravidade que pode ser variável consoante a informação dada pelos pacientes ou mesmo da análise feita pelos clínicos.

Sabe-se que as alterações a nível renal constituem um dos sintomas característicos de uma maior gravidade da doença devido a deposição de imunocomplexos circulantes no rim (Chen et al, 2007). Neste estudo não foi possível obter essa relação, tendo sido observados como sintomas mais frequentes as alterações cutâneas e a artrite,

relacionados geralmente com a presença do anticorpo anti-SSA. Estes quando analisados em simultâneo em relação aos pacientes com sintomatologia, apresentaram uma relação com uma maior actividade da doença. É sabido que estas correlações podem diferir, consonte a etnia, sexo, idade e até a localização geográfica onde o estudo é efectuado. Neste tipo de conexões são frequentes as excepções, existindo doentes serologicamente activos e clinicamente quiescentes e vice-versa, situações que criam bastantes problemas clínicos, particularmente no tocante à atitude terapêutica a assumir (Ferreira, 1998; Swaak et al, 1996)).

Na análise dos parâmetros laboratoriais, dos 36 pacientes com diagnóstico de lúpus segundo os critérios da ACR, 17 apresentaram anticorpos anti- nucleares (ANAs) com títulos considerados positivos. Seria de esperar uma maior percentagem visto esta análise frequentemente ser utilizada para despiste das doenças autoimunes, porém e muito provavelmente devido à terapêutica administrada a estes pacientes esse título pode baixar e consequentemente encontrarem-se resultados negativos para os referidos anticorpos.

Fez-se a pesquisa do anticorpo anti-dsDNA em todos os pacientes, independentemente do resultado dos ANAs tendo sido detectados 10 pacientes com anti- dsDNA positivo com títulos negativos de ANAs. Tal facto poderá ser explicado pelo diferente método de pesquisa visto terem sido feitos por imunofluoresência indirecta e ELISA, respectivamente. No entanto e embora pareça ser uma contradição, Pedraz e colaboradores referem, em 2007, que tal pode acontecer em pacientes que apresentam alterações cutâneas e presença de anticorpos anti-Ro-52. Para além desses 10 pacientes com título de ANAs negativos foram detectados mais 9 pacientes com dsDNA positivo prefazendo um total de 19 pacientes com dsDNA positivo.

Para além do anticorpo anti-dsDNA foi frequente a presença de outros autoanticorpos nos pacientes com LES. Neste estudo o outro autoanticorpo mais frequente foi o anti-Ro-52 estando na maioria dos casos associado aos anticorpos anti-SSA e anti-SSB, sendo que estes autoanticorpos aparecem com maior frequência no Síndrome de Sjögren embora também apareçam nos pacientes com LES. Os anticorpos anti.-nucleossomas aparecem quase que exclusivamente nos pacientes com LES, tendo-se obtido apenas uma frequência de 12% para estes anticorpos nos indivíduos analisados.

Tal com já foi referido os pacientes com LES apresentam uma taxa de apoptose superior à dos indivíduos saudáveis e durante o processo de apoptose há libertação de



nucleossomas, o que explica o facto dos níveis de dsDNA estarem aumentados nestes doentes (Emlen et al, 1994; Benucci et al, 2003; Huck et al, 1999). Porém os anticorpos anti-nucleossomas não são detectados com a mesma frequência devido à diminuta sensibilidade destes anticorpos embora sejam altamente específicos desta patologia (Combe, 1989).

Em conclusão os dados obtidos mostraram que os anticorpos dsDNA apareceram com maior frequência (cerca de 53%) e dentro dos ANAs positivos (cerca de 47%) os autoanticorpos mais frequentes foram o anti-Ro-52 em associação com os anti-SS o que reflete, tal como foi referido, uma maior frequência das alterações cutâneas nestes pacientes.

A ligação dos anticorpos anti-DNA a outros antígenos formam complexos que podem levar a activação da cascata do complemento, normalmente pela via clássica, e consequentemente ao seu consumo (Ho et al, 2001; Saisoong et al, 2006; Brasington et al, 2003). Por essa razão estes pacientes apresentam níveis das fracções do complemento diminuídas e no seguimento deste estudo fez-se a correlação da presença do anticorpo anti-dsDNA com a concentração do factor C4 do complemento. Não foi possível obter uma relação significativa, no entanto o resultado pode ser interpretado como ambíguo devido à proximidade com o valor “cut-off” e tendo em consideração a dimensão da amostra.

Para além disso observou-se uma forte relação entre os factores C3 e C4, visto ambos se encontrarem diminuídos, sendo esta associação maior no grupo dos pacientes ( $p=0,732$ ) face ao grupo controlo ( $p=0,483$ ).

Embora haja muitos estudos sobre esta patologia, de um modo geral estes incidem sobre factores genéticos de predisposição e nesse contexto foi publicado por vários investigadores que haveria um grupo de linfócitos T, os linfócitos T reguladores (CD4+CD25+), que estariam diminuídos nestes pacientes, fracção que representa apenas cerca de 5% dos CD4 (Takahashi et al, 2000; Marta, 2005; Enredo et al, 2006; Hori et al, 2003; Lyssuk, 2007).

Os linfócitos T auxiliares (CD4) são o grupo de células que vão “direccionar” a resposta imune (Brian et al, 2003) e como tal pensou-se que a caracterização desta população linfocitária avaliada em conjugação com as outras populações linfocitárias pudesse de alguma forma contribuir para a monitorização da resposta à terapêutica e ainda como um parâmetro que contribuisse na avaliação da actividade da doença. O excesso de

linfócitos T auxiliares e a orientação desses linfócitos no sentido da resposta Th2 conduz a uma hiperactividade dos linfócitos B e à produção de autoanticorpos alguns dos quais patogénicos (Mok et al, 2003). Com o objectivo de estudar estas populações linfocitárias fez-se a sua determinação nos dois grupos, pacientes e controlos, e concluiu-se que no grupo de pacientes os valores absolutos dos linfócitos totais eram significativamente inferiores aos do grupo controlo ( $p < 0,01$ ), consequentemente os valores das subpopulações linfocitárias (CD4, CD8, CD3, CD19, CD16) também foram significativamente inferiores no grupo de pacientes. De acordo com um dos objectivos deste trabalho verificou-se, tal como Horowitz em 1997, um decréscimo nos valores absolutos dos linfócitos e suas populações no grupo de pacientes com LES face ao grupo controlo.

Posteriormente analisou-se as percentagens das subpopulações linfocitárias nos dois grupos, e verificou-se que os valores dos linfócitos T auxiliares (CD4) eram significativamente inferiores no grupo de pacientes em relação ao grupo dos controlos, mas os valores dos linfócitos T citotóxicos (CD8) não apresentaram diferença significativa nos dois grupos. Isto fez com que a razão CD4/CD8 fosse inferior (estatisticamente significativa  $p < 0,01$ ) no grupo dos pacientes pois houve um menor decréscimo das linfócitos CD8 em relação aos CD4.

Na literatura encontram-se autores que observaram em seus estudos (Morimoto et al, 1980; Maeda et al, 1999; Junker, 2004) aumento da razão CD4/CD8 devido a um decréscimo dos linfócitos CD8, e outros estudos (Smolen et al, 1982; Bakke et al, 1983) que verificaram um decréscimo de linfócitos CD4 e consequentemente um decréscimo da razão CD4/CD8. Matsushit e colaboradores admitem que um aumento desta razão bem como uma diminuição da expressão do DR-HLA nas células T são bons indicadores da eficácia terapêutica.

O facto dos valores percentuais dos linfócitos CD4 aparecerem diminuídos sem que haja um aumento significativo dos linfócitos CD8 o que pode ser o reflexo da terapêutica administrada. No entanto também poderá ser explicado pelo facto da determinação das populações linfocitárias terem sido feitas apenas pontualmente ao invés de terem sido feitas várias vezes ao longo da evolução da doença. Outro factor a ter em consideração é que na observação dos gráficos se pode verificar uma maior dispersão dos resultados no grupo dos pacientes. Este resultado poderá ser devido à multiplicidade de sintomas destes pacientes o que lhes confere diferentes estados

pato/fisiológicos e variabilidade nas análises laboratoriais efectuadas. Por outro lado pensa-se que na continuação desta linha de investigação o aumento da amostra poderá conduzir a uma clarificação dos resultados.

Ainda na interpretação dos gráficos das percentagens das populações linfocitárias, para além dos CD4 a única população que diferiu, com significado estatístico nos dois grupos, foi a dos CD19, que marcam os linfócitos B. Os linfócitos B são os mediadores da resposta humoral, e como tal estes após sofrerem diferenciação dão origem às células de memória e aos plasmócitos, produzindo estes últimos anticorpos que são característicos desta patologia (Abbas & Lichtman, 2003; Roitt et al., 2001). Pode pois considerar-se que estes linfócitos estão significativamente diminuídos por estarem, tal como já foi mencionado no texto, relacionados com o número linfócitos T auxiliares que irão direccionar para um tipo de resposta do sistema imunológico.

O principal objectivo desta dissertação era após avaliação da actividade da doença e a determinação das populações linfocitárias, verificar se os pacientes em que foi atribuída maior actividade da doença possuíam menor número de linfócitos. Esse pressuposto foi verificado pois os valores absolutos das populações linfocitárias em todas as subpopulações apresentaram uma diferença estatisticamente significativa em que quanto maior a actividade da doença menor foi o número de linfócitos e das subpopulações linfocitárias.

Na avaliação da actividade da doença com as percentagens das subpopulações linfocitárias não foram obtidas diferenças estatisticamente significativas e mais uma vez observa-se graficamente que as distribuições das amostras, especialmente quando há actividade da doença, foi bastante ampla o que provavelmente se deve mais uma vez a multiplicidade de situações clínicas analisadas como também devido à relativa pequena dimensão da amostra considerada.

Consoante a actividade da doença estes pacientes apresentaram menor concentração dos factores do complemento, devido provavelmente a formação dos complexos antígeno-anticorpo. Foi estatisticamente significativo ( $p < 0,01$ ) tanto para o factor C3 como para o factor C4, o que poderá ser um bom marcador da severidade desta patologia

A terapêutica instituída tem grande importância a nível da resposta imunológica, o tratamento com esteróides e ciclosporinas levam a uma melhoria das manifestações clínicas e segundo alguns autores ao aumento da razão CD4/CD8 (Matsushita et al, 2000; Morimoto et al, 1980; Maeda et al, 1999). Neste estudo vinte e três doentes

descreveram a terapêutica instituída. As doses dos medicamentos foram alteradas consoante a sintomatologia dos pacientes durante as consultas de rotina não se alterando o medicamento mas sim a dose, por isso qualquer avaliação estatística tem um significado relativo devido à dimensão da amostra e aos dados fornecidos pelos referidos pacientes.

Fez-se uma correlação entre as quatro classes terapêuticas e a actividade da doença e graficamente visualizou-se que há uma paciente que referiu apenas o anti-malárico como terapêutica e não apresentava actividade da doença e as outras classes de terapêutica corresponderam tanto aos pacientes com moderada como alta actividade da patologia.

O tratamento estatístico indicou que existe uma forte probabilidade de quem não tem actividade da doença tomar a terapêutica da classe 1 e aos pacientes que têm actividade da doença é-lhes administrada a terapêutica correspondente à classe 2. Com efeito tratam-se de doentes que tomam medicamentos não só para minimizar os efeitos e a sintomatologia como também para evitar surtos de sintomas clínicos que comprovadamente aumentam na ausência de terapêutica.

## 6 PERSPECTIVAS FUTURAS

Presume-se que o aumento de susceptibilidade possa resultar da capacidade particular que estes indivíduos têm para sintetizar determinados anticorpos que são especialmente patogénicos e /ou da existência de uma perturbação que impede a regulação eficaz da hiperactividade dos linfócitos B e T.

Algumas vias que podem conduzir a este estado patológico estão identificadas, nomeadamente a predisposição genética aliada a estímulos ambientais e hormonais.

Uma das linhas de investigação que deverá manter-se incide sobre o envolvimento dos genes Fox3P e CTL4 – A no aparecimento e patogenia da doença. Dentro dessa linha de pesquisa é extremamente importante o papel dos linfócitos T reguladores que constituem apenas uma pequena percentagem (2-5%) de linfócitos T auxiliares. Tais células estão comprovadamente diminuídas nos pacientes com LES, mas muitas vezes aparecem aumentados em outras patologias tais como a artrite reumatóide. Seria interessante relacionar esses linfócitos, marcados duplamente com CD4+CD25+, com outras subpopulações linfocitárias e verificar como se comportam ao longo da terapêutica administrada visto ter sido já evidenciado que estão sob controlo genético e parecer notória a importância desta pequena percentagem de células na tolerância imunológica.

Considero fundamental que qualquer estudo relacionado com pacientes com LES deve ser feito com uma amostra de maior dimensão e com seguimento mais prolongado, devendo ser efectuadas várias colheitas das amostras biológicas ao longo do tempo, visto se tratar de pacientes que apresentam flutuações de actividade e de sintomatologia. Seria muito interessante caracterizar ao longo da evolução da doença as diferentes populações linfocitárias, especialmente os linfócitos T auxiliares que podem desempenhar, tal como os linfócitos T reguladores, um papel importante na patogenese do LES e ainda a determinação da razão CD4/CD8 a fim de verificar consoante a terapêutica se há ou não variação dessas populações, para que um dia a contagem destas células possa constituir uma ferramenta útil da resposta ao tratamento ou de actividade da doença.

## 7 BIBLIOGRAFIA

Abbas, A.K., Lichtman, A.H. (2003). Cellular and Molecular Immunology, 5<sup>th</sup> ed. Saunders Comp., U.S.A.

Almuzara, A.C., Adrados, J.A.G., San José, E.G., Ogando, R.A., Ruiz, E.B., Cubero, S. O., Urueña, N.M., Martín, V.L., Pereda, A. (2006). Prácticas de Immunologia General. Licenciatura em Medicina. Universidade de Valladolid.

Avrameas, S., Dighiero, G., Lymberi, P. (1983). Studies on natural antibodies and autoantibodies. *Ann Immunol*, 134D: 103-113.

Avrameas, S. (1991). Natural autoantibodies from “horror autotoxicus” to “gnothi seauton” *Immunol Today*, 12:154-159.

Bandeira, A., Coutinho, A., Marinez, C., Pereira, P. (1988). The origin of “natural antibodies” and the internal activity in the immune system. *Int Rev Immunol*, 198 (3):47-58.

Bakke, A.C., Kirkland, P.A., Kitridou, R.C., Quismorio, F.P., Rea, T., Ehresmann, G.R. (1983). T lymphocyte subsets in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 26: 745-750.

Barreto, M., Santos, E., Ferreira, R., Fesel, C., Fontes, M.F., Pereira, C., Martins, B., Andreia, R., Viana, J. F., Crespo, F., Vasconcelos, C., Ferreira, C., Vicente, A. (2004). Evidence for CTLA4 as a susceptibility gene for systemic lupus erythematosus. *European Journal of Human Genetics*, 12 (8):620-625.

Barreto, M. (2005). Identification and Characterization of Genetic Susceptibility Factors to Systemic Lupus Erythematosus. Dissertação de Tese de Doutoramento, Lisboa.

- Benucci, M., Gobbi, F.L., Del Rosso, A., Cesaretti, S., Nicoli, L., Cantini, F. (2003). Disease activity and antinucleosome antibodies in systemic lupus erythematosus. *Scand J Rheumatol*, 32(1):42-45.
- Bernard, J., Lévy, J.P., Clauvel, J.P., Rain, J.D., Varet, B. (1976). Abrégé d'Hématologie. 3<sup>ed</sup> Copyright .Masson Editor.Paris.
- Bombardier, C., Gladman, D.D., Urowitz, M. B., Caron, D., Chang, C.H. (1992). Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. *The Committee on Prognosis Studies in SLE. Arthritis Rheum*, 35 (6):630-640.
- Busser, B.W., Adair, B.S., Erikson, J. and Laufer, T.M. (2003). Activation of diverse repertoires of autoreactive T cells enhances the loss of anti-dsDNA B cell tolerance. *J. Clin. Invest*, 112: 1361-1371.
- Brasington, R.D., Kahl, L.E., Ranganathhan, P., Latinis, K.M., Velazquez, C., Atkinson, J.P. (2003). Immunologic rheumatic disorders. *J Allergy Clin. Immunol*, 111:593-601.
- Brian L. (1996) Systemic Lupus Erythematosus (1996). *ScienceDirect, Cell.* , 85 (3) 303-306.
- Burnet, F. M. (1959). Clonal Selection theory of acquired immunity. Cambridge University Press. London.
- Chen, J. A., Meister, S., Urbonaviciute, V., Rodel, F., Wilhelm, S., Kalden, J.R., Manger, K., Voll, R.E. (2007). Sensitive detection of plasma/serum DNA in patients with systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity*, 40(4):307-310.
- Combe, B., Rucheton, M., Graafland, H., Lussier, V., Brunel, C., Sany, J. (1989). Clinical significance of anti-RNP and anti-Sm antibodies as determined by immunoblotting and immunoprecipitation in sera from patients with connective tissue diseases. *Clin Exp Immunol*, 75 (1):18-24.

Cordeiro, A. (1963) Doenças do conectivo. Temas de Medicina. Ed Laboratórios Atral. Lisboa.

Corell, A. (2006). Regulacion de la Respuesta Inmune. Inmunologia General. 2º Medicina. Universidad de Valladolid.

Craft, J., Fatenejad, S. (1997). Self antigens and epitope spreading in systemic autoimmunity. *Arthritis Rheum*, 40: 1374-1382.

Crispin, J.C., Martínez, A., Alcocer- Varela, J. (2003). Quantification of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J. Autoimm* 21 (3):273-276.

Crispin, J.C., Vargas, M.I., Alcocer- Varela, J. (2004). Immunoregulatory T cells in autoimmunity. *Reviews Autoimmunity*, 3 (2):45-51.

Dall'Era, M. and Davis, J.C. (2003). Systemic lupus erythematosus- How to manage, when to refer. *PostGraduate Medicine*, 114 (5):31-40.

Dall'Era, M. and Davis, J.C. (2004). Systemic lupus erythematosus. *PostGraduate Medicine*, 22 (5): 33-41.

Dutschmann, L.A., (2006). Lupus eritematoso sistémico: alguns aspectos históricos. *Rev. Med. Interna*. 13 (2): 133-140.

Emlen, W., Niebur, J., Kadera, R. (1994). Accelerated in vitro apoptosis of lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol*, 152 (7): 3685-3692.

Enredo, S., Ono, M., Setoguchi, R., Yagi, H., Hori, S., Fehervari, Z., Shimizu, J., Takahashi, T., Nomura, T. (2006). Foxp3+CD25+CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev*, 212: 8-27.

FACSCalibur™ SYSTEM User's Guide (1996). Immunocytometry Systems. Becton Dickinson



Ferreira, C.A.M. (1998). Reactividade Imunológica no Lúpus Eritematoso Sistémico; sua possível correlação com padrões clínicos e espectro de amins com função neural. Dissertação de tese de Doutoramento, Lisboa.

Goldsby, R.A., kindt, T. J., Osborne, B.A., Kubly, J. (2003). *Immunology* (5<sup>th</sup> Ed.). W. H. Freeman and Company, New York, USA.

Gordon, C., Sutcliffe, N., Skan, J., Stoll, T and Isenberg, D. A. (2003). Definition and treatment of lupus flares measured by the BILAG index. *Rheumatology*, 42:1372-1379.

Goulvestre, C. (2006). Antinuclear antibodies. *Presse Med.*35 (2 Pt 2): 287-295

Ho, A., Barr, S. G., Magder, L.S., Petri, M. (2001). A decrease in complement is associated with increased renal and hematologic activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 44 (10): 2350-2357.

Holmberg, D., Wennerstrom, G., Andrade, L., Coutinho, A. (1986). The high idiotypic connectivity of “natural” newborn antibodies is not found in adult mitogen-reactive B cell repertoires. *Eur J Immunol*, 16: 82-87.

Hori, S., Takahashi, T., Sakaguchi, S. (2003). Control of autoimmunity by naturally arising regulatory CD4<sup>+</sup>T cells. *Adv Immunol*, 81: 331-371.

Horowitz, D.A., Stohl, W., Gray, J.D. (1997). T lymphocytes, natural Killer cells, cytokines, and immune regulation. In: Wallance DJ, Harn BH. Eds Dubois, lupus erythematosus. Baltimore: Willians & Wikins, 155-159.

Huck, S., Deveaud, E., Namane, A., Zouali, M. (1999). Abnormal DNA methylation and deoxycytosine-deoxyguanine content in nucleosomes from lymphocytes undegoing apoptosis. *FASEB J*, 13(11):1415-1422.

Humbell, R.L. (1994). Autoanticorps et maladies autoimmunes. Collection Opion Bio, Elsevier Edit, Paris, 279.

Ibañez, D., Gladman, D., Urowitz, M. (2007). Summarizing disease features over time: II. Variability measures of SLEDAI. *J Rheumatol*, 34 (2): 336-340.

Inui, A., Ogasawara, H., Sekigawa, I., Takasaki, Y., Takamori, K., Ogawa, H. (2007). Estrogen receptor expression by peripheral blood mononuclear cells of patients with systemic lupus erythematosus, *Clin Rheumatol*, 26 (10): 1675-1678.

Jacob, L., Trom, F., Lety, M.A., Bach J.F. (1986). Idiotypes of monoclonal anti-DNA antibodies produced in autoimmune B/W mice are expressed in normal mice. *Clin Exp Immunol*, 63: 402-407.

Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M., Capra, J.D. (1999). *Immuno Biology – The immune system in health and disease*. 4<sup>ed</sup>. Garland Publishing. Cambridge.

Junker, P. (2004). *Erythematosus Systemic Lupus*. Dissertação. Dinamarca do Sul

Kayser, C., Coelho Andrade, L.E. (2003) Thymus dysfunction and possible implications in immunologic alterations in Systemic Lupus Erythematosus. *Rev Bras. Reumatol*, 43 (1):26-31.

Kotzin, B. L. (1996). Systemic lupus erythematosus. *Cell*, 85 (3): 303-306.

Lahita, R.G. (1993). Sex hormones as immune modulators of disease. *Ann.NY. Acad. Sci*, 658: 278-287.

Lindqvist, A.K., Alarcón-Riquelme, M.E. (1999). The Genetics of systemic lupus erythematosus. *Scand J Immunol*, 50(6):562-571.

Lyssuk, E.Y., Torgashina, A.V., Soloviev, S.K., Nasonov, E.L., Bykovskaia, S.N. (2007). Reduced number and function of CD4+CD25+ high FoxP3+ regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Adv Exp Med Biol*, 601: 113-119.

- Maeda, N., Sekigawa, I., Iida, N., Matsumoto, M., Hashimoto, H., Hirose, S. (1999). Relationship between CD4+/CD8+ T Cell Ratio and T Cell Activation in Systemic Lupus Erythematosus. *Scandinavian Journal of Rheumatology*, 28(3): 166-170.
- Matsushita, M., Hayashi, T., Ando, S., Sekigawa, I., Iida, N., Hashimoto, H., Hirose, S. (2000). Changes of CD4/CD8 Ratio and Interleukin-16 in Systemic Lupus Erythematosus. *Journal Clinical Rheumatology*, 19(4):270-274.
- Morimoto, C., Reinherz, E.L., Schur, P.H., Mills, J.A., Steinberg, A.D. (1980). Alteration in T cell subsets in active systemic lupus erythematosus. *J. Clin Invest*, 66: 1171-1174.
- Mosca, M., Bombardieri, S. (2006). Assessing remission in systemic lupus erythematosus. *Clin. Exp Rheumatol*, 24 (43):S100-104.
- Mok, C.C., Lau, C.S. (2003). Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Journal of Clinical Pathology journals*, 56: 481-490.
- Nikolich-Zugich, J., Slifka, M. K., Messaoudi, I., (2004). The many important facets of T-cell repertoire diversity. *Nature Reviews Immunology*, 4: 123-132.
- Nossal, G.J.V. (1983). Cellular mechanisms of immunological tolerance. *Ann Rev Immunol*, 1: 33-62.
- Pedraz, T., Bernabeu, P., Vela, P. (2007). Lupus Eritematoso Sistémico. *Rev Sociedad Val. Reumatologia*, 2(2): 18-32.
- Petri, M. (2002). Epidemiology of systemic lupus erythematosus. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 16: 847-858.
- Ramírez, L.M.B., Serrano, M.E.D., Zamora, A. C., Arroyo, F. G., Espuñes, T. R.S., Pérez, F. M. (2004). Citometria de Flujo: vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 17(1): 42-55.

Reason, I., Nisihara, R., Chiu, Y., Kirschfink, M.(2002). Complement activation products as sensitive markers of systemic lupus erythematosus activity.*Rev Reumatol.*, 42(3):154-159

Rider, V., Foster, R.T., Evans, M., Suenaga, R., Abdou, N.I. (1998). Gender differences in autoimmune diseases: estrogen increases calcineurin expression in Systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol Immunopathol*, 89(2): 171-180

Roitt, I., Brostoff, J. Male, D. (2001). *Immunology* (6<sup>th</sup> Ed.).Mosby International Ltd, London.

Saisoong,S., Eiam-Ong, S., Hanvivatvong, O. (2006). Correlations between antinucleosome antibodies and anti-double- stranded DNA antibodies, C3, C4, and clinical activity in lupus patients.*Clin Exp Rheumatol*, 24(1):51-58.

Smolen, J.S., Chused, T.M., Leiserson, W.N., Reeves, J.P., Alling, D., Steinerg, A.D. (1982). Heterogeneity of immunoregulatory T-cell subsets in systemic lupus erythematosus. *Am J Med*, 72: 783-790.

Shoenfeld,Y., Isenberg,DA. (1989). Natural autoimmunity. In *The Mosaic of Autoimmunity*. Amsterdam Elsevier, 10: 53-74.

Stoll, T., Seifert, B., Isenberg, D.A. (1996). SLICC/ACR Damage Index is valid, and renal and pulmonary organ scores are predictors of severe outcome in patients with systemic lupus erythematosus. *British journal of rheumatology*,.35(3): 248-254.

Strand, V., Gladman, D., Isenberg, D., Petri, M., Smolen, J., Tugwell, P. (1999). Outcome measures to be used in clinical trials in systeic lupus erythematosus. *J. Rheumatol.*,. 26(2): 490-497.

Swaak, A.J.G, Smeenk, R.J.T. (1996). Following the disease course in systemic lupus erythematosus: are serologic variables of any use? *J Rheumatol*, .23: 1842-1844.

Tan, E. M., Cohen, A. S., Fries, J. S., Masi, A. T., McShane, D. J., Rothfield, N. F., Schaller, J.G., Talal, N., Winchester, R. J. (1982). The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus – letter. *Arthritis Rheum*, 25: 1271-1277.

Takahashi, T., Tagami, T., Yamazaki, S., Uede, T., Shimizu, J., Sakaguchi, N., Mak, T.W. and Sakaguchi, S. (2000). Immunologic Self – Tolerance Maintained by CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Regulatory T Cells Constitutively Expressing Cytotoxic T Lymphocyte – associated Antigen 4. *The Journal of Experimental Medicine*, 192(2): 303-310.

Wakeland, E. K., Liu, K., Graham, R.R., Behrenst, W. (2001). Delineating the genetic basics of systemic lupus erythematosus. *Immunity*, 15 (3): 397- 408.

Wallach, J. (2002). Interpretación clínica de las pruebas de laboratorio. (4ª ed). Masson. Madrid. España.

1. [http://wikipedia.org/wiki/Immune\\_system](http://wikipedia.org/wiki/Immune_system) (em 28-02-2007)
2. [http://pwp.netcabo.pt/sistema.imune/sistema\\_imunitario.htm](http://pwp.netcabo.pt/sistema.imune/sistema_imunitario.htm) (em 02-03-2007)
3. <http://post.queensu.ca/~forsdyke/theorimm0.htm>
4. <http://www.fda.gov/CDER/guidance> (em 23-05-2007)
5. [www.rheumatology.org/publications/classification/SLE/sle.asp?aud=men](http://www.rheumatology.org/publications/classification/SLE/sle.asp?aud=men) (em 30-06-2007)
6. [www.sbn.org.br](http://www.sbn.org.br)
7. [www.labodia.com/en7ana/Atlas/anaatlasnuclear.htm](http://www.labodia.com/en7ana/Atlas/anaatlasnuclear.htm)

**ANEXO 1 – Critérios de classificação  
criados pelo *American College Rheumatology*  
para definir um indivíduo com LES.**

**The 1982 Revised Criteria for Classification of Systemic Lupus Erythematosus**

<b>Criterion</b>	<b>Definition</b>
1. Malar rash	Fixed erythema, flat or raised, over the malar eminences, tending to spare the nasolabial folds
2. Discoid rash	Erythematous raised patches with adherent keratotic scaling and follicular plugging; atrophic scarring may occur in older lesions
3. Photosensitivity	Skin rash as a result of unusual reaction to sunlight, by patient history or physician observation
4. Oral ulcers	Oral or nasopharyngeal ulceration, usually painless, observed by physician
5. Arthritis	Nonerosive arthritis involving 2 or more peripheral joints, characterized by tenderness, swelling, or effusion
6. Serositis	a) Pleuritis--convincing history of pleuritic pain or rubbing heard by a physician or evidence of pleural effusion OR b) Pericarditis--documented by ECG or rub or evidence of pericardial effusion
7. Renal disorder	a) Persistent proteinuria greater than 0.5 grams per day or greater than 3+ if quantitation not performed OR b) Cellular casts--may be red cell, hemoglobin, granular, tubular, or mixed
8. Neurologic disorder	a) Seizures--in the absence of offending drugs or known metabolic derangements; e.g., uremia, ketoacidosis, or electrolyte imbalance OR b) Psychosis--in the absence of offending drugs or known metabolic derangements, e.g., uremia, ketoacidosis, or electrolyte imbalance
9. Hematologic disorder	a) Hemolytic anemia--with reticulocytosis OR b) Leukopenia--less than 4,000/mm <sup>3</sup> total on 2 or more occasions OR c) Lymphopenia--less than 1,500/mm <sup>3</sup> on 2 or more occasions OR d) Thrombocytopenia--less than 100,000/mm <sup>3</sup> in the absence of offending drugs
10. Immunologic disorder	a) Positive LE cell preparation OR b) Anti-DNA: antibody to native DNA in abnormal titer OR c) Anti-Sm: presence of antibody to Sm nuclear antigen OR d) False positive serologic test for syphilis known to be positive for at least 6 months and confirmed by <i>Treponema pallidum</i> immobilization or fluorescent treponemal antibody absorption test
11. Antinuclear antibody	An abnormal titer of antinuclear antibody by immunofluorescence or an equivalent assay at any point in time and in the absence of drugs known to be associated with "drug-induced lupus" syndrome

\* The proposed classification is based on 11 criteria. For the purpose of identifying patients in clinical studies, a person shall be said to have systemic lupus erythematosus if any 4 or more of the 11 criteria are present, serially or simultaneously, during any interval of observation.

*Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1982;25:1271---7.*

## **ANEXO 2 - Índice de SLEDAI (*Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index*)**



### Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI)

Valeur	Manifestations	Définition
8	Convulsion	Apparition récente. Exclusion des causes métaboliques, infectieuses ou médicamenteuses
8	Psychose	Perturbation de l'activité normale en rapport avec une altération sévère de la perception de la réalité. Comprend : hallucinations, incohérence, appauvrissement du contenu de la pensée, raisonnement illogique, comportement bizarre, désorganisé ou catatonique. Exclusion d'une insuffisance rénale ou d'une cause médicamenteuse
8	Atteinte cérébrale	Altération des fonctions mentales avec troubles de l'orientation, de la mémoire ou autre d'apparition brutale et d'évolution fluctuante. Comprend : troubles de la conscience avec réduction des capacités de concentration, incapacité à rester attentif avec en plus 2 au moins des manifestations suivantes : troubles perceptifs, discours incohérent, insomnie ou somnolence diurne, augmentation ou diminution de l'activité psychomotrice.
8	Troubles visuels	Atteinte rétinienne du lupus. Comprend : nodules dysoriques, hémorragies rétinienues, exsudats séreux ou hémorragies choroïdiennes, névrite optique. Exclusion d'une cause hypertensive, infectieuse ou médicamenteuse.
8	Nerfs crâniens	Neuropathie sensitive ou motrice d'apparition récente touchant un nerf crânien
8	Céphalées	Céphalées sévères et persistantes, pouvant être migraineuses mais résistant aux antalgiques majeurs.
8	AVC	Accident vasculaire cérébral d'apparition récente. Artériosclérose exclue.
8	Vascularite	Ulcérations, gangrène, nodules digitaux douloureux, infarctus péri-unguéaux ou preuve histologique ou artériographie de vascularite.
4	Arthrites	Plus de 2 articulations douloureuses avec des signes inflammatoires locaux (douleur, tuméfaction ou épanchement articulaire).
4	Myosite	Douleur/faiblesse musculaire proximale associées à une élévation des CPK et/ou aldolases ou à des modifications électromyographiques ou à une biopsie montrant des signes de vascularite.
4	Cylindres urinaires	Cylindres de globules rouges
4	Hématurie	> 5 GR / champ en l'absence de lithiase, d'infection ou d'une autre cause.
4	Protéinurie	>0,5 g/24h. Apparition récente ou majoration récente de plus de 0,5g/24h
4	Pyurie	> 5 GB/champ en l'absence d'infection
2	Alopécie	Apparition récente ou récurrence d'une alopécie en plaque ou diffuse.
2	Ulcères muqueux	Apparition récente ou récurrence d'ulcérations orales ou nasales
2	Pleurésie	Douleur thoracique d'origine pleurale avec frottement ou épanchement ou épaississement pleural.
2	Péricardite	Douleur péricardique avec au moins l'une des manifestations suivantes : frottement, épanchement ou confirmation électrographique ou échographique.
2	Complément	Diminution du CH50, du C3 ou du C4 < à la normale inférieure du laboratoire
2	Anti-ADN	Positivité > à 25% par le test de Farr ou taux > à la normale du laboratoire
1	Fièvre	>38° en l'absence de cause infectieuse
1	Thrombopénie	< 100 000 plaquettes/mm3
1	Leucopénie	< 3 000 GB/mm3 en l'absence de cause médicamenteuse.

Bombardier C., Gladmann D.D., Urowitz M.B., Caron D., Chang C.H., and the Committee on prognosis studies in SLE – Derivation of the SLEDAI : a disease activity index for lupus patients. *Arthritis Rheum.*, 1992, 35, 630-640.

## **ANEXO 3 – Sintomatologia dos pacientes com LES**

Caracterização das Populações Linfocitárias em pacientes com Lúpus Eritematoso Sistémico, e sua relação com a actividade da doença

Doentes LES	Actividade da doença	Início de Sintomatologia	Data de Diagnóstico	Duração de Doença	Exantema malar	Alterações cutâneas	Fotosensibilidade	Úlceras Orais	Artrite	Serosite	Alterações Renais	Alterações Neurológicas
1	2	1963	2003	44	1	1	1					1
2	1	2004	2006	3	1	1	1	1			Proteinúria 1	
3	2	2000	2000	7				1			Proteinúria 1	1
4	0	1983	1983	24	1	1	1		1			
5	2	1987	1989	20		1		1	1			1
6	0	1972	1987	35		1	1		1	1		1
7	1	1955	1982	52	1	1	1	1	1	1		1
8	1		1995	12				1	1			
9	0	2003	2004	4	1	1	1	1	1		1	1
10	1	2001	2002	6	1				1			
11	1	1979	1989	28			1	1	1		1	
12	0	1996	2004	11	1	1						1
13	2		1997	10	1	1			1			1
14	1	1998	1998	9		1		1		1		
15	0	2004	2006	3		1			1			
17	1	2004	2004	3					1		1	
18	2	1999	2003	8	1	1	1		1			
19	1	2003	2003	4		1	1		1			1
20	1	1985	2003	22			1	1		1		1
21	0	2006	2006	1	1	1	1					1
22	1	2006	2006	1		1			1			
23	1	1984		23		1	1		1			1
24	1	1988	1993	19	1	1	1		1			
25	0	1967	1984	40	1	1	1	1	1		1	
26	2	1992	1993	15					1		Proteinúria 1	
27	0		2000	7		1	1					
28	1		1976	31				1	1		1	1
29	1	1991	1992	16	1	1	1	1	1	1	Proteinúria 1	1
70	1		1992	15	1	1		1	1			
71	2		1980	27		1			1			
72	1	1976	1985	31	1	1	1	1	1	1	1	1
73	2	1991	1999	16				1	1	1		
74	1		1986	30		1	1	1				
75	1	2001	2004	6	1	1			1		1	
76	2	1999	1999	7		1		1	1		1	1
77	1	2001	2001	6	1	1		1	1			

## **ANEXO 4 - Parâmetros laboratoriais determinados nos pacientes com LES**

**Caracterização das Populações Linfocitárias em pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico, e sua relação com a actividade da doença**

<b>Doentes LES</b>	<b>PCR (0.00-0.80) mg/dl</b>	<b>C3 (79.0-152) mg/dl</b>	<b>C4 (16.0-38.0) mg/dl</b>	<b>Absorvância</b>	<b>DNA (ELISA)</b>	<b>ANAs (Título 1/160)</b>	<b>ANAs (Título 1/640)</b>	<b>ENA (Imunoblotting)</b>
1	0,932	91,6	12,2	1074	Pos Forte	Negativo	Negativo	Não fiz
2	<0,100	72,9	7,4	88	Neg	Positivo 1/160	Negativo	SSA e Ro-52 (fortes),SSB (forte)
3	0,286	79,5	11,1	1036	Pos Forte	Negativo	Negativo	dsDNA e Nucleossomas fortes, SSA forte e Ro-52 fraco
4	0,211	82,3	17,0	29	Neg	Posit fraco mosqueado	Posit 1/320	dsDNA fraco, SSA e SSB e Ro-52 fortes
5	0,209	76,3	15,3	706	Pos Moderado	Negativo	Negativo	Não fiz
6	0,828	124,0	27,7	84	Neg	Negativo	Negativo	Não fiz
7	<0,100	97,0	14,5	126	Neg	Negativo	Negativo	Não fiz
8	0,192	93,3	16,1	689	Pos Moderado	Negativo	Negativo	Não fiz
9	0,417	101,0	20,5	59	Neg	Negativo	Negativo	Nada
10	0,243	95,5	10,0	725	Pos Moderado	Negativo	Negativo	Não fiz
11	0,645	93,6	13,1	1211	Pos Forte	Negativo	Negativo	Não fiz
12	1,130	138,0	27,7	96	Neg	Negativo	Negativo	Não fiz
13	0,335	53,1	10,4	105	Neg	Positivo 1/160	Negativo	Ro-52, SSB
14	0,820	121,0	22,8	103	Neg	Positivo 1/160	Negativo	RNP/Sm
15	<0,100	82,4	15,3	60	Neg	Negativo	Negativo	Não fiz
17	0,115	73,3	11,5	140	Neg	Negativo	Negativo	Não fiz
18	<0,100	62,4	13,1	2397	Pos Forte	Negativo (1/80)	Negativo	Não fiz
19	0,215	77,5	13,2	626	Pos Moderado	negativo	Negativo	dsDNA fraco
20	0,350	89,7	9,0	59	Neg	Posit (Homogeneo)	Posit(Homog 1/1280)	CENP B forte, Scl70 fraco, SSB forte, SSA e Ro-52 fortes
21	0,109	99,1	15,3	74	Neg	Negativo	Negativo	Nada
22	0,285	69,0	6,4	660	Pos Moderado	Positivo mto fraco	Negativo	Histonas fraco , dsDNA e Nucleosomas fracas
23	0,703	106,0	24,5	363	Pos Moderado	Positivo mto fraco	Negativo	Histonas, dsDNA e Nucleosomas fracos e Ro-52 mto fraca
24	0,305	88,2	14,1	156	Neg	Positivo mto fraco	Negativo	SSA, Ro52, SSB
25	0,226	102,0	15,3	75	Neg	Negativo	Negativo	Não fiz
26	1,610	48,5	2,7	2011	Pos Forte	Positivo mto fraco	Negativo	M2 fraca, Histonas fraca, dsDNA e Nucleosomas fortes
27	0,233	155,0	17,1	104	Neg	Positivo mto fraco	Negativo	SSA, Ro-52, SSB
28	1,430	112,0	19,9	757	Pos Moderado	Negativo	Negativo	dsDNA fraco
29	0,458	117	16	1861	Pos Forte	Negativo	Negativo	dsDNA (fracas as bandas de nucleossomas e histonas)
70	1,74	101	18,7	60	Neg	Positivo 1/320 -Mosqueado	Neagativo	SSA, Ro-52 (fraquinhaSSB,histonas)
71	0,175	60,8	11,1	1515	Pos Forte	Positivo 1/320 - Periferico	Negativo	Histonas, dsDNA, nucleossomas,SSA, Ro-52
72	0,221	88,9	14,1	89	Neg	Negativo	Negativo	Negativo
73	2,09	67,5	11,6	2128	Pos Forte	Positivo -Mosqueado	Positivo	SSA, SSB, dsDNA, Ro52 (fraca nucleossomas)
74	<0,100	72,7	14	738	Pos Moderado	Positivo 1/320	Negativo	SSB (bandas fracas de dsDNA e SSA)
75	0,326	81,6	11,2	632	Pos Moderado	Positivo 1/160	Negativo	Histonas (fracas dsDNA enucleossomas)
76	<0,100	64,5	15,1	645	Pos Moderado	Positivo 1/160	Negativo	SSA, Ro52 (fracas dsDNA,nucleossomas e ribossoma P)
77	0,128	81,5	10,4	2050	Pos Forte	Positivo 1/320	Negativo	dsDNA, nucleossomas

## **ANEXO 5 - Parâmetros laboratoriais determinados no grupo dos controlos**

**Caracterização das Populações Linfocitárias em pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico, e sua relação com a actividade da doença**

---

<b>Controlo</b>	<b>PCR (0.00-0.80) mg/dl</b>	<b>C3 (79.0-152) mg/dl</b>	<b>C4 (16.0-38.0) mg/dl</b>	<b>DNA (ELISA)</b>	<b>ANAs (Título 1/160)</b>
32	0,270	136,0	27,1	Neg	Neg
33	<0,100	113,0	16,0	Neg	Neg
34	0,965	153,0	20,2	Neg	Neg
35	0,431	158,0	39,0	Neg	Neg
36	<0,100	86,0	18,6	Neg	Neg
37	<0,100	84,1	18,8	Neg	Neg
38	0,223	93,5	23,4	Neg	Neg
39	0,292	144,0	26,7	Neg	Neg
40	0,277	142,0	26,0	Neg	Neg
41	<0,100	116,0	15,6	Neg	Neg
42	0,399	99,0	24,1	Neg	Neg
43	0,119	105,0	26,2	Neg	Neg
44	0,991	103,0	19,5	Neg	Neg
45	1,880	155,0	31,4	Neg	Neg
46	0,328	93,5	16,2	Neg	Neg
47	0,143	88,7	26,0	Neg	Neg
48	0,901	95,3	18,6	Neg	Neg
49	0,247	164,0	30,6	Neg	Neg
50	<0,100	100,0	27,3	Neg	Neg
51	<0,100	105	28,2	Neg	Neg
52	0,16	148	20,9	Neg	Neg
53	0,813	119	19	Neg	Neg
54	<0,100	112,5	24,5	Neg	Neg
55	0,184	127	21,1	Neg	Neg
56	0,22	123	20,4	Neg	Neg
57	0,212	128	22,6	Neg	Neg
58	1,19	144	26,9	Neg	Neg
59	<0,100	99,6	26,1	Neg	Neg
60	0,104	73,5	18,0	Neg	Neg
61	0,277	98,0	17,5	Neg	Neg
62	0,432	106,0	32,0	Neg	Neg

## **ANEXO 6 - Valores das populações linfocitárias nos pacientes com LES**



Caracterização das Populações Linfocitárias em pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico, e sua relação com a actividade da doença

Doentes LES	Actividade da doença	Linf Totais	Linf. Th (CD4)		Linf. Tc (CD8)		Linf. T(CD3)		Linf. B(CD19)		Natural Killer (CD16)		Razão (CD4/CD8) (1-1,5)
		1600-2400 (28-39%)	(700-1100 cel./ml)	(38%-46%)	(500-900 cel./ml)	(31%-40%)	(1100-1700 cel./ml)	(67%-76%)	(200-400 cel./ml)	(11%-16%)	(200-400 cel./ml)	(10%-19%)	
1	2	777	346	44%	249	32%	595	77%	102	13%	80	10%	1.42
2	1	1612	805	50%	321	20%	1361	84%	98	6%	153	9%	2.51
3	2	468	199	41%	170	35%	373	79%	12	3%	83	17%	1.17
4	0	1706	828	49%	392	23%	1266	74%	307	17%	133	8%	2.11
5	2	581	239	41%	167	29%	416	71%	93	16%	72	12%	1.43
6	0	2618	1135	43%	849	32%	2005	76%	345	13%	268	10%	1.34
7	1	2031	1100	52%	792	37%	1934	95%	94	5%	3	0%	1.39
8	1	1741	1027	58%	357	20%	1384	79%	116	7%	241	14%	2.88
9	0	1819	712	38%	606	32%	1318	72%	298	16%	203	11%	1.18
10	1	1612	1015	63%	469	29%	1518	94%	77	5%	17	1%	2.16
11	1	1497	568	36%	627	39%	1195	79%	203	14%	99	7%	0.91
12	0	2218	738	33%	901	40%	1695	76%	232	10%	291	13%	0.82
13	2	578	210	36%	326	56%	541	93%	27	5%	10	2%	0.64
14	1	800	218	28%	86	11%	318	40%	314	38%	168	20%	2.55
15	0	1588	699	42%	372	23%	1109	68%	175	11%	304	19%	1.88
17	1	1168	454	38%	627	53%	1081	92%	62	5%	25	2%	0.72
18	2	655	213	32%	263	40%	477	72%	47	7%	131	20%	0.81
19	1	1837	614	34%	534	29%	1586	85%	207	11%	44	2%	1.15
20	1	1014	424	42%	370	37%	823	80%	61	6%	130	13%	1.15
21	0	2200	763	34%	1084	49%	1884	85%	180	8%	136	6%	0.70
22	1	2032	766	36%	818	39%	1650	79%	234	11%	148	7%	0.94
23	1	1035	479	43%	388	35%	929	86%	53	5%	53	5%	1.23
24	1	1533	798	48%	230	14%	1034	65%	409	27%	90	6%	3.48
25	0	1063	455	39%	388	34%	843	74%	75	7%	145	14%	1.17
26	2	894	389	43%	220	24%	616	68%	87	10%	191	21%	1.77
27	0	1122	380	31%	433	35%	835	71%	145	13%	142	13%	0.88
28	1	1064	442	42%	274	26%	743	69%	104	9%	217	20%	1.61
29	1	1505	498	34%	755	51%	1273	89%	22	2%	110	8%	0.66
70	1	450	186	41%	123	27%	320	70%	34	7%	96	21%	1.51
71	2	699	256	35%	333	46%	589	82%	13	2%	97	14%	0.77
72	1	811	350	42%	366	44%	716	87%	48	6%	47	6%	0.96
73	2	542	168	32%	248	47%	417	76%	47	8%	78	14%	0.68
74	1	606	219	36%	177	29%	422	68%	73	12%	111	18%	1.24
75	1	1128	554	51%	303	28%	909	80%	195	17%	24	2%	1.83
76	2	897	337	38%	176	20%	558	62%	81	9%	258	28%	1.91
77	1	3179	1995	61%	712	22%	2739	85%	375	12%	65	2%	2.8

## **ANEXO 7 - Valores das populações linfocitárias no grupo dos controlos**

Caracterização das Populações Linfocitárias em pacientes com Lúpus Eritematoso Sistémico, e sua relação com a actividade da doença

Controlo	Linf Totais	Linf. Th (CD4)		Linf. Tc (CD8)		Linf. T(CD3)		Linf. B(CD19)		Natural Killer (CD16)		Razão (CD4/CD8) (1-1,5)
		(700-1100 cel./µl)	(38%-46%)	(500-900 cel./ml)	(31%-40%)	(1100-1700 cel./ml)	(67%-76%)	(200-400 cel./ml)	(11%-16%)	(200-400 cel./ml)	(10%-19%)	
32	2275	1116	51	602	28	1804	79	231	10	240	10	1,85
33	1534	598	37	406	25	1015	64	232	15	287	18	1,47
34	1670	993	56	472	27	1465	85	81	5	124	8	2,11
35	1799	901	49	522	29	1479	81	208	11	112	6	1,73
36	2159	1196	55	479	22	1731	77	293	13	135	6	2,5
37	1142	477	40	361	30	908	78	162	14	72	6	1,32
38	1263	548	41	573	43	1121	86	46	4	96	8	0,96
39	1268	608	45	408	30	1021	78	128	10	120	9	1,49
40	2631	1046	41	720	28	1959	74	422	16	250	9	1,45
41	1086	787	42	311	17	1102	60	229	13	475	26	2,53
42	1969	953	44	642	30	1595	78	176	9	198	11	1,48
43	1783	1005	56	318	18	1357	74	231	13	195	11	3,17
44	1137	587	51	374	33	961	84	81	7	95	8	1,57
45	2549	1322	47	732	26	2054	78	272	11	223	9	1,81
46	2823	1211	42	1219	42	2470	86	140	5	213	7	0,99
47	2213	1063	49	570	26	1799	80	211	9	203	9	1,87
48	1405	744	52	313	22	1090	76	248	17	67	5	2,37
49	2164	1145	54	389	18	1626	74	356	16	182	8	2,94
50	1471	677	45	400	27	1224	81	172	11	75	5	1,69
51	1691	870	48	277	15	1147	66	344	21	200	12	3,14
52	1919	857	46	365	20	1282	67	378	19	259	13	2,35
53	2661	1170	44	810	31	2048	76	173	6	440	16	1,44
54	2456	942	37	833	33	1813	73	342	14	301	12	1,13
55	1978	1200	58	405	20	1605	78	289	16	84	5	2,96
56	2663	1286	46	765	28	2051	75	359	13	253	9	1,68
57	1724	889	49	443	25	1332	74	273	16	119	7	2,01
58	1199	654	55	217	18	891	74	265	22	43	4	3,01
59	1869	783	40	492	25	1326	68	255	13	288	15	1,59
60	1471	841	56	285	19	1146	77	220	15	105	7	2,95
61	1834	618	34	669	36	1453	77	98	5	283	15	0,92
62	2092	833	40	634	31	1537	72	305	14	250	11	1,31

## **ANEXO 8 – Relação da actividade da doença com a classe terapêutica**

**Caracterização das Populações Linfocitárias em pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico, e sua relação com a actividade da doença**

---

<b>Pacientes com LES</b>	<b>Actividade da doença</b>	<b>Classe Terapêutica</b>
1	2	4
2	1	4
3	2	2
4	0	-
5	2	4
6	0	-
7	1	-
8	1	3
9	0	-
10	1	4
11	1	2
12	0	2
13	2	-
14	1	3
15	0	-
17	0	4
18	2	3
19	1	-
20	1	2
21	0	2
22	1	4
23	0	3
24	1	-
25	0	-
26	2	2
27	0	1
28	1	-
29	1	-
70	1	4
71	2	-
72	1	-
73	2	2
74	1	4
75	1	4
76	2	4
77	1	3